

THESIS / THÈSE

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Recherche de partenaires de Sp Skp1/p19 par double hybride

Tafforeau, Lionel

Award date:
2000

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



**FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX
NAMUR**

Faculté des Sciences

Recherche de partenaires de *Sp* Skp1/p19 par double-hybride

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
licencié en Sciences biologiques**

Lionel TAFFOREAU

Juin 2000

Recherche de partenaires de *SpSkp1/p19* par double-hybride

TAFFOREAU Lionel

Résumé

Le cycle cellulaire des eucaryotes est un événement finement régulé par l'action concertée de différentes protéines activatrices ou inhibitrices, notamment des protéines de transduction du signal, des kinases, des facteurs de transcription, ... La protéine Skp1 occupe une place centrale dans deux complexes, le kinétochore et le SCF, intervenant à ce niveau dans la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

Le kinétochore est un complexe multiprotéique se liant à l'ADN centromérique et assurant à l'intervention de la protéine Skp1 le lien avec un microtubule dont dépend la ségrégation chromosomique correcte.

Le SCF (Skp1, Culline, protéine à E-box) est un complexe nécessaire au ciblage par marquage à l'ubiquitine de protéines vers le protéasome. Dans ce complexe, Skp1 interagit avec une Culline, avec une protéine à " E-box ", et avec les protéines Sgt1 et Rbx1. Ce complexe SCF intervient dans le cycle cellulaire en recrutant spécifiquement des protéines telles que des cyclines, des inhibiteurs de CDK, ...

Le gène encodant la protéine Skp1 a été cloné au laboratoire chez *Schizosaccharomyces pombe*. L'implication de cette protéine dans des complexes similaires à ceux de *Saccharomyces cerevisiae* n'est, à ce jour, pas démontrée.

Nous avons effectué un crible " double-hybride " dans le but de découvrir des partenaires physiques de la protéine *SpSkp1*. Les résultats de l'analyse d'une fraction des clones positifs isolés a permis d'identifier notamment une protéine à F-box (Pop2), ce qui valide le crible. D'autres clones sont en cours d'analyse.

Mémoire de licence en Sciences Biologiques

Juin 2000

Promoteur: J. Vandenhoute, Laboratoire de Génétique Moléculaire, U.R.B.M.

Remerciements

Je tiens, avant toute chose, à remercier Monsieur Vandenhoute pour m'avoir accueilli dans son laboratoire, ainsi que pour ses précieux conseils lors de la correction de ce travail.

Je remercie également les lecteurs X. De Bolle, J. Delcour, P. Dumont et D. Fretin d'avoir accepté de consacrer un peu de leur temps à la lecture de ce mémoire.

A Sophie, j'adresse mes plus vifs remerciements pour m'avoir guidé tout au long de ces quelques mois. Je lui suis reconnaissant de m'avoir fait goûter aux plaisirs de la recherche.

Je remercie également, dans le désordre, Flore, Damien, Monique, Dominique, Isabelle, Godefroid, Rose-Marie, Max, Vincent, David, Mme Libion, tous les membres de GéMo pour tout ce qu'on a partagé pendant quelques mois. Je n'oublie pas non plus tous les membres de l'URBM, surtout ceux qui ont eu leur anniversaire durant ce trimestre.

Je tiens à remercier Beth Furnari, qui nous a fourni la banque d'ADN complémentaire de *S. pombe*, ainsi que le plasmide pAS1; Tomi Mäkelä pour nous avoir fourni les souches de levure MAV203 et la souche de *E. coli* KC8, et Marc Vidal pour la souche de levure MAV103 ainsi que les plasmides pPC86 et pPC97.

Je remercie ma famille, particulièrement mes parents qui m'ont toujours soutenu. Je remercie également Sarah, qui n'a pas toujours eu la vie facile ces derniers mois mais qui est restée à mes côtés.

Je remercie également Philippe et Benoît pour ces moments de compréhension et d'échange importants lors de ce mémoire.

I. INTRODUCTION	3
AVANT-PROPOS	3
1 SKP1 ET LE COMPLEXE CENTROMÈRE/KINÉTOCHORE	4
1.1 Description générale du centromère et du kinétochore : partenaires CIS et TRANS de la ségrégation chromosomique	4
1.1.1 Le centromère, élément CIS de la ségrégation chromosomique	4
1.1.2 Le kinétochore, facteur TRANS de la ségrégation chromosomique	4
1.2 Le complexe constituant le CDEIII-CBF3	5
1.2.1 Quatre sous-unités composent CBF3	5
1.2.2 La sous-unité Cbf3c contrôle l'activité de CBF3	6
2 SKP1 ET LA PROTÉOLYSE	7
2.1 Le "pathway" de l'ubiquitinylation, menant à la protéolyse	7
2.1.1 Les enzymes impliquées dans l'ubiquitinylation des protéines à dégrader	8
2.1.2 Le protéasome 26S	8
2.2 Des éléments CIS et des facteurs TRANS spécifient le substrat.	9
2.2.1 Les éléments CIS, signaux de dégradation	9
2.2.2 Les facteurs TRANS, enzymes reconnaissant les substrats à dégrader	9
2.2.3 Les SCF	10
2.3 Un exemple particulier de régulation protéolytique : le rôle du SCF dans le cycle cellulaire	11
II. OBJECTIFS DU TRAVAIL	12
III. RÉSULTATS	13
1 PRINCIPE, CONFECTION DES OUTILS ET MISE EN OEUVRE DU CRIBLE DOUBLE-HYBRIDE	13
2.4 Définition et particularités du système double-hybride	13
2.5 Construction et vérification des outils	14
2.5.1 Les souches de levure utilisées : MAV103 et MAV203	14
2.5.2 Plasmide appât "multicopy"	14
2.5.2.1 Construction	14
2.5.2.2 Vérification de l'expression de la fusion Gal4BD-HA-Skp1	15
2.5.2.3 Vérification de l'absence de transactivation basale des trois gènes rapporteurs	15
2.5.3 Plasmide appât "low copy"	16
2.5.3.1 Construction du plasmide appât pDHI1-skp1	16
2.5.3.2 Vérification de la fusion Gal4BD-Skp1	17
2.5.3.3 Vérification de l'absence de transactivation basale des trois gènes rapporteurs	17
2.5.4 Vérification de la diversité de la banque d'ADNc de <i>S.pombe</i>	18
2.5.4.1 Description	18
2.5.4.2 Vérification de la diversité de la banque	18
2.6 Mise en oeuvre du crible double-hybride	18
2.6.1 Déroulement du crible et des transformations	19
3 ANALYSE DES 16 PREMIERS CANDIDATS	21
3.1 Procédure d'identification des clones candidats	21
3.2 Caractérisation des candidats	22
4. CONCLUSIONS, DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES	23
CONCLUSIONS GÉNÉRALES ET DISCUSSION	23
PERSPECTIVES	26
5. MATÉRIEL ET MÉTHODES	27
1 SOLUTIONS ET TAMPONS	27
1.1 Solutions	27
1.2 Tampons	30
2 MILIEUX DE CULTURE	33
2.1 Bactéries	33
2.2 Levures : <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
3 SOUCHES ET PLASMIDES	37
3.1 Souches	37
3.2 Plasmides	37
3.3 Banque de cDNA	38
4 TECHNIQUES RELATIVES AUX PROTÉINES	39
4.1 Extraction des protéines de levures	39

Table des matières

4.2	<i>Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)</i>	40
4.3	<i>Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western-Blot)</i>	42
4.4	<i>Immunodétection</i>	42
5	TECHNIQUES RELATIVES À L'ADN	45
5.1	<i>Les réactions de restriction</i>	45
5.2	<i>L'électrophorèse sur gel d'agarose</i>	46
5.3	<i>La purification d'ADN</i>	47
5.4	<i>La réaction de ligation</i>	49
5.5	<i>La transformation</i>	50
5.6	<i>La préparation d'ADN</i>	54
5.7	<i>La PCR ou Polymerase Chain Reaction</i>	58
5.8	<i>Le séquençage automatique de l'ADN</i>	59
6.	BIBLIOGRAPHIE	62

Liste des abréviations courantes.⁽¹⁾

A	: Adénosine
aa	: acide aminé
Amp	: Ampicilline
ATP	: Adénosine TriPhosphate
ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADNc	: ADN complémentaire
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNm	: ARN messenger
C	: Cytidine
Da	: Daltons
dNTP	: DésoxyriboNucléoside 5' TriPhosphate
ddNTP	: DiDéoxyriboNucléoside 5' TriPhosphate
DO	: Densité Optique
G	: Guanosine
kb	: 10 ³ bases
kd	: 10 ³ Daltons
LB	: milieu Luria-Bertani
mM	: milliMolaire
M	: Molaire
MCS	: Multiple Cloning Site
NLS	: Nuclear Localisating Signal
ORF	: Open Reading Fame
pb	: paire de bases
PCR	: Polymerase Chain Reaction
RNase	: Ribonucléase
rpm	: rotation par minute
T	: Thymidine
3-AT	: 3-AminoTriazole
UAS	: Upstream Activating Sequence
URS	: Upstream Repressing Sequence
X-Gal	: 5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β -Dgalactopyranoside
μ l	: microlitre
μ M	: micromolaire

⁽¹⁾ Les abréviations et symboles des gènes, des protéines et des complexes utilisés sont expliqués dans le texte.

Conventions génétiques.

Notation du gène et de la protéine qu'il encode :

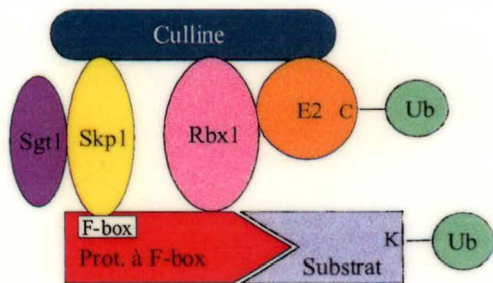
Les diverses conventions quant à la notation des gènes et des protéines sont reprises, au moyen d'exemples, dans le tableau ci-dessous.

Organisme	Gène	Protéine
<i>S. pombe</i>	<i>skp1</i>	Skp1 ou Skp1p
<i>S. cerevisiae</i>	<i>LEU2</i>	Leu2 ou Leu2p
<i>E. coli</i>	<i>leuB</i>	LeuB
mammifères	<i>Cdk2</i>	CDK2

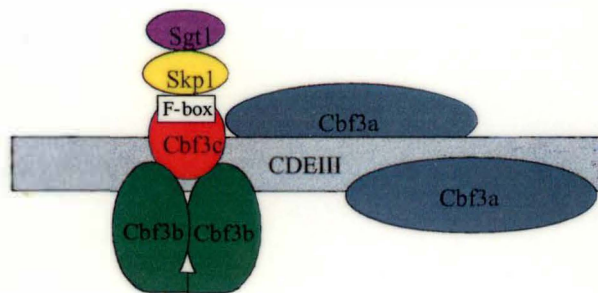
Préfixes pour désigner l'appartenance spécifique d'un gène ou d'un produit d'un gène :

Sc : *Saccharomyces cerevisiae*
Sp : *Schizosaccharomyces pombe*
Ec : *Escherichia coli*

Skp1 articule la protéine à F-box et la culline dans le SCF.



Skp1 est impliqué dans l'activation du kinétochore.



Introduction

Avant-propos

La complexité accrue des cellules eucaryotes comparées aux cellules procaryotes ne résulte pas tant d'un accroissement important du nombre de gènes, comme on le pensait il y a encore quelques années, que du développement plus important d'un réseau d'interactions régulatrices. Ces combinaisons de régulations agissent tant au niveau transcriptionnel que traductionnel. Un exemple particulièrement représentatif en est la dynamique du cycle cellulaire, contrôlée par des régulations géniques et par des régulations protéiques, et ce en réponse à des signaux internes aussi bien qu'externes.

Parmi les régulations post-traductionnelles, la place de la protéolyse apparaît de plus en plus comme prépondérante.

La dégradation des protéines cellulaires est médiée soit par un constituant subcellulaire, la vacuole, soit par une protéase dépendante de l'ATP, le protéasome. Ces deux composants doivent reconnaître le substrat à dégrader. L'ubiquitinylation offre une possibilité d'orienter les substrats vers ces complexes de dégradation.

1 Skp1 et le complexe centromère/kinétochore

1.1 Description générale du centromère et du kinétochore : partenaires CIS et TRANS de la ségrégation chromosomique

Deux évènements majeurs rythment le cycle cellulaire : la synthèse de l'ADN (Phase S) et la cytokinèse ou mitose proprement dite (Phase M), séparées temporellement par les étapes G1 (Gap1) et G2 (Gap2). La partition équationnelle du matériel héréditaire nécessite, outre la réplication de l'ADN, la condensation de la chromatine en chromosomes, l'organisation de ceux-ci sur la plaque métaphasique et leur ségrégation contrôlée spatialement et temporellement vers les centrosomes (Hutchison and Glover, 1995).

Le déroulement harmonieux de ces étapes dépend de deux structures particulières : le centromère et le kinétochore dont l'action conjuguée conditionnera l'association des chromatides soeurs et leur amarrage au fuseau mitotique.

1.1.1 Le centromère, élément CIS de la ségrégation chromosomique

La structure centromérique la plus étudiée est le centromère de *Saccharomyces cerevisiae* en raison de sa taille restreinte à 125 bases. En comparaison, chez *Schizosaccharomyces pombe*, cette région couvre 40 kb, et elle atteint 200 kb chez *Drosophila melanogaster* et un Mb chez les mammifères (Carbon and Clarke, 1990; Lechner and Carbon, 1991).

Chez *S. cerevisiae*, le centromère des 16 chromosomes est constitué de trois domaines nommés CDEI, CDEII et CDEIII. CDEI est défini par un consensus de 8 paires de bases: (A/G)TCAC(A/G)TG. CDEII est une région de 78-86 paires de bases riche en AT (90%). CDEIII couvre un domaine minimal de 56 paires de bases constituant un "core" CDEIII. Diverses mutagénèses ont montré que la délétion de CDEI provoque une augmentation d'un facteur 10 de la fréquence de ségrégation fautive des chromosomes tandis que la délétion d'une partie de CDEII annihile la fonction du centromère. CDEIII, avec son triplet central CCG, est également essentiel pour la fonction du centromère (Lechner and Ortiz, 1996).

1.1.2 Le kinétochore, facteur TRANS de la ségrégation chromosomique

Le kinétochore est un complexe protéique qui couvre la région centromérique. Plusieurs rôles lui sont attribués : d'une part, il assure la fixation des chromatides soeurs aux microtubules du fuseau mitotique et, d'autre part, il interagirait avec des molécules motrices nécessaires au mouvement des chromosomes le long des microtubules lors de l'anaphase, notamment la dynéine cytoplasmique (Maney *et al.*, 2000).

Les protéines constitutives du complexe kinétochore sont classées et nommées en fonction de leur zone d'interaction avec les domaines nucléotidiques du centromère. Nous parlerons de CBF pour Centromere Binding Factor et on les nommera CBF1 ou CBF3 selon qu'ils interagissent avec CDEI ou CDEIII.

La figure 1a schématise l'organisation centromère-kinétochore. Deux sous-complexes multiprotéiques peuvent être isolés : CBF1 et CBF3 (Lechner and Carbon, 1991).

CBF1 est non essentiel et sa délétion conduit à une augmentation dans les défauts de ségrégation chromosomique. CBF1 se dimérise grâce à un motif "helix-loop-helix" et interagit sous forme d'homodimère avec CDEI.

CBF3 est un complexe multiprotéique formé de quatre types de sous-unités notées de a à d, décrit au point suivant (Lechner and Carbon, 1991).

Centromère et kinétochore apparaissent donc comme deux structures intimement imbriquées de par leur localisation et leur fonction complémentaire.

1.2 Le complexe constituant le CDEIII-CBF3

1.2.1 Quatre sous-unités composent CBF3 ⁽¹⁾

CBF3, complexe multiprotéique se liant au CDEIII, est constitué de 4 sous-unités : Cbf3a (110 kd), Cbf3b (64 kd), Cbf3c (58kd) et Cbf3d (23kd) codés respectivement par *NDC10* (pour Non DisjunCtion gene), *CEP3* (pour CEntromere Protein), *CTF13* (pour Centromere Transmission Fidelity) et *SKP1*⁽²⁾ (pour Suppressor of Kinetochore Protein) (Lechner and Carbon, 1991; Stemmann and Lechner, 1996). Ces quatre gènes sont essentiels pour la croissance cellulaire et la déficience d'un seul des composants du CBF3 engendre des défauts dans la ségrégation des chromosomes. Bien que les quatre sous-unités soient nécessaires pour la liaison au centromère, seules Cbf3b et Cbf3c se lient à l'ADN.

Cbf3b possède un domaine d'interaction à l'ADN de type doigt de Zinc (Zn_2Cys_6) localisé dans la région N-terminale de la protéine. Deux motifs d'interaction protéine-protéine ont été mis en évidence : la région C-terminale acide de la protéine dont la délétion annihile la fonction de CBF3 et une région hydrophobe formée d'une répétition de 7 acides aminés se structurant en hélice α . Ces motifs pourraient être impliqués dans la dimérisation de cette sous-unité (Lechner, 1994). La figure 1b présente les nucléotides impliqués dans la liaison aux protéines du complexe CBF3. Des données récentes montrent que l'un des deux monomères se lie au triplet CCG très conservé dans les 16 chromosomes de *S. cerevisiae*, tandis que le second pourrait se lier au triplet TGT situé 12 paires de bases à gauche du CCG (Espelin *et al.*, 1997).

Cbf3c est une protéine interagissant également avec l'ADN centromérique. Les nucléotides impliqués sont spécifiés sur la figure 1b. Outre sa fonction d'interaction avec l'ADN centromérique, Cbf3c est la protéine "pont" entre les différents partenaires du complexe CBF3. En effet, cette protéine possède un motif F-Box⁽³⁾ médiant son interaction avec Skp1. Cependant, ce motif F-box n'est pas suffisant pour lier Skp1. Des expériences de délétion montrent qu'une région localisée entre les acides aminés 336 et 412 est également requise

⁽¹⁾ Le complexe multiprotéique CBF3 est noté en caractères majuscules, tandis que les sous-unités le composant sont notées Cbf3a, Cbf3b, Cbf3c et Cbf3d.

⁽²⁾ La sous-unité Cbf3d, encodée par le gène *SKP1* est dorénavant notée Skp1 dans le texte.

⁽³⁾ Le paragraphe relatif aux protéines à F-box est abordé au point 2.2.3.

pour l'interaction avec Skp1. Plusieurs tests de purification sur colonne ont montré que Cbf3c se liait également à Cbf3b et Cbf3a (Russell *et al.*, 1999).

Cbf3a est une protéine de 110 kd qui se lie de manière non spécifique à l'ADN. Elle est capable de former des homodimères qui participent à la formation du complexe CBF3. La figure 1a montre qu'une oligomérisation de Cbf3a est observée et permet de définir un complexe CBF3 étendu.

Skp1 est une petite protéine de 23 kd isolée lors d'une recherche de suppresseurs d'un mutant *ctf13-30* présentant un phénotype de thermosensibilité (Connelly and Hieter, 1996). La fonction de cette protéine est toujours hypothétique : les données *in vitro* suggèrent un rôle potentiel de Skp1 dans un "pathway" d'activation de Cbf3c, plutôt qu'un rôle de constituant physique du kinétochore (Kaplan *et al.*, 1997).

1.2.2 La sous-unité Cbf3c contrôle l'activité de CBF3

Au sein du complexe CBF3, seule Cbf3c est instable et de ce fait capable de réguler par sa présence l'activité du CBF3 et donc du kinétochore. Des expériences menées par Sorger ont abouti à proposer une régulation du kinétochore dépendante d'une part de l'activation de Cbf3c et, d'autre part, de sa dégradation (Kitagawa *et al.*, 1999). En régulant la quantité de Cbf3c actif, la cellule régule le nombre de kinétochores fonctionnels de sorte qu'à chaque chromosome, un et un seul kinétochore soit associé (Kaplan *et al.*, 1997).

La figure 2 résume les hypothèses relatives aux deux voies alternatives de régulation de Cbf3c : l'activation (figure 2a) ou la dégradation (figure 2b).

Deux modèles d'activation de Cbf3c sont présentés à la figure 2a:

Soit, la protéine Cbf3c peut être activée grâce à un activateur X inconnu à l'heure actuelle. Celui-ci serait recruté par le complexe formé de Cbf3c, de Skp1 et de Sgt1 (pour Suppressor of G2 allele of *skp1*). Une fois activée Cbf3c se dissocierait de Skp1 et de Sgt1 et serait la cible de la dégradation par le protéasome, ou alternativement s'associerait au complexe formé par Cbf3a et Cbf3b et se lierait à l'ADN centromérique. Ce dernier complexe protéine-ADN est stable.

Soit, la protéine Cbf3c, par son association avec Skp1 et Sgt1, recruterait un complexe protéique afin de reconstituer *in situ* un SCF^{Cbf3c (1)} qui ciblerait la dégradation d'un inhibiteur Y, inconnu, de Cbf3c. L'inhibiteur Y dégradé, le complexe CBF3 deviendrait actif.

La figure 2b représente un modèle de dégradation de Cbf3c.

La protéine Cbf3c pourrait être dégradée par le protéasome 26S via le "pathway" de l'ubiquitine grâce à un SCF^{Cdc4} (Kaplan *et al.*, 1997; Kitagawa *et al.*, 1999).

Dans les modèles élaborés sur base des données actuelles on voit que Cbf3d, codé par *SKP1*, jouerait un rôle fonctionnel important dans la régulation de la constitution du kinétochore actif.

⁽¹⁾ Le SCF est un complexe protéique constitué de Skp1, d'une culline et d'une protéine à F-box. Dans les SCF, la nature de la protéine à F-box est stipulée en indice supérieur. Par exemple, ici, c'est un SCF dont la protéine à F-box est Cbf3c.

2 SKP1 et la protéolyse

Les régulations des voies métaboliques, du cycle cellulaire, ... s'effectuent à divers niveaux :

- le niveau génique avec des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles,
- le niveau protéique avec des régulations traductionnelles et post-traductionnelles.

Récemment le clonage du gène *SKP1* chez *S. cerevisiae* et l'analyse des phénotypes des mutants indiquent que le rôle de cette protéine implique une autre voie de régulation : la protéolyse (Bai *et al.*, 1996).

La dégradation protéolytique peut être menée soit dans une structure subcellulaire, la vacuole, soit par une protéase dépendante de l'ATP, le protéasome. De plus, la protéolyse est médiée par l'ubiquitine, offrant par l'ajout de cette petite protéine de 76 résidus, une régulation fine d'un "pathway" réversible. D'une part, la voie d'ubiquitylation d'un substrat à dégrader se fait par une reconnaissance spécifique de celui-ci. D'autre part, l'ubiquitine peut être enlevée du substrat (par une hydrolase spécifique à l'ubiquitine), permettant ainsi une libération de la protéine et rendant le processus d'ubiquitylation réversible. Une fois que la protéine marquée entre dans le protéasome (ou la vacuole), le processus de dégradation est irréversible (Hilt and Wolf, 1996).

2.1 Le "pathway" de l'ubiquitylation, menant à la protéolyse

(Ciechanover, 1998)

La dégradation d'une protéine par la voie de l'ubiquitylation se déroule en deux étapes successives. La première consiste à "tagger" la protéine par une réaction de polyubiquitylation impliquant trois enzymes (l'activation de l'ubiquitine, son transfert sur l'enzyme reconnaissant la protéine à dégrader et la formation finale d'une chaîne d'ubiquitines fixées de manière covalente à la protéine à dégrader). Cette voie est illustrée à la figure 3.

Dans la seconde étape, la protéine est dégradée par un complexe subcellulaire, le protéasome 26S. Le substrat est reconnu par la sous-unité régulatrice 19S puis est déployée et pénètre dans le cylindre catalytique 20S. Ce mécanisme est illustré à la figure 6.

La voie de la polyubiquitylation constitue une régulation post-traductionnelle du "turn-over" des protéines importante pour de nombreux "pathways" dans la cellule: régulation du cycle cellulaire, transduction du signal, voies métaboliques,...

Comme schématisé dans la figure 4, la structure d'un tel système est hiérarchisée. Une seule E1 active les ubiquitines nécessaires aux étapes ultérieures. Cette enzyme peut transférer l'ubiquitine à plusieurs types de E2, et chaque E2 peut à son tour interagir avec différentes E3. A l'heure actuelle, seules quelques E3 ont été identifiées mais il apparaît qu'une E3 peut recruter plusieurs substrats. Par exemple, chez *S. cerevisiae*, une seule E1 est connue et peut transférer l'ubiquitine activée à 11 E2 qui interagissent avec plusieurs E3. Chaque E3 pourra ubiquityler un ou plusieurs substrats, comme par exemple, l'enzyme E3 SCF^{Cdc4} reconnaît les protéines Sic1 et Cbf3c (Bai *et al.*, 1996; Kaplan *et al.*, 1997).

2.1.1 Les enzymes impliquées dans l'ubiquitylation des protéines à dégrader

L'enzyme E1 active l'ubiquitine, une protéine de 76 aa, en formant une liaison thioester entre un résidu cystéine interne et la glycine C-terminale de l'ubiquitine. Cette liaison, énergétique, requiert de l'ATP. L'ubiquitine ainsi activée est transférée sur l'"ubiquitin conjugating enzyme" (Ubc ou E2), par la formation d'un lien thioester sur une cystéine interne fortement conservée.

Ensuite, E2 permettra le transfert de l'ubiquitine au substrat, soit directement, soit par l'intermédiaire d'une ubiquitine ligase E3.

Bien qu'une interaction physique entre E2 et le substrat ait déjà été obtenue lors de cribles d'interaction protéine-protéine, la signification physiologique d'un transfert direct d'ubiquitine de E2 au substrat-cible n'est pas clair (Hershko and Ciechanover, 1998). Plus que probablement, les fonctions spécifiques de E2 résultent de son association avec les E3 distinctes.

L'ubiquitine ligase, ou E3, se lie au substrat à dégrader, soit directement par des motifs d'interaction protéine-protéine, soit indirectement par une protéine "chaperone" ou similaire. Elle intervient dans la réaction de transfert de l'ubiquitine activée sur la protéine à "tagger". Deux hypothèses sont suggérées pour ce transfert d'ubiquitines au substrat (Ciechanover *et al.*, 2000).

Soit, E2 transfère l'ubiquitine activée à E3 qui forme un composé intermédiaire E3-ubiquitine par un lien thioester. Ensuite, elle ubiquitylerait le substrat, comme c'est le cas des E3 à domaine HECT.

Soit, E3 est un adaptateur qui reconnaît la protéine à dégrader et possède également un site de fixation pour E2, ce qui faciliterait l'ubiquitylation par un rapprochement de l'enzyme et du substrat. On peut donner comme exemple le SCF ou l'APC (pour Anaphase Promoting Complex).

L'ubiquitine est liée à la protéine sur le groupement ϵ -NH₂ d'une lysine du substrat. Une chaîne de plusieurs ubiquitines est alors formée, où la glycine 76 de chaque ubiquitine est liée sur une lysine (généralement la lysine 48) de l'ubiquitine précédente. Une chaîne de minimum quatre ubiquitines est nécessaire à une reconnaissance au niveau du protéasome 26S (Dubiel and Gordon, 1999).

Les ubiquitines ligases sont des protéines ou des complexes hétéroprotéiques qui spécifient les substrats à dégrader. Elles reconnaissent des substrats grâce à des motifs de dégradation. Il existe plusieurs familles de E3 et chaque famille reconnaît un panel de substrats définis par des motifs différents⁽¹⁾.

2.1.2 Le protéasome 26S

Ce complexe multimérique de 2 Md est composé d'un corps catalytique 20S cylindrique flanqué à ses deux extrémités d'un complexe régulateur 19S. Cette protéase reconnaît des protéines polyubiquitylées, mais peut aussi dégrader des protéines non-ubiquitylées comme par exemple l'ornithine décarboxylase (Murakami *et al.*, 1999).

⁽¹⁾ Les catégories de signaux de dégradation et de E3 seront abordés aux points 2.2.1 et 2.2.2, respectivement.

La figure 5 illustre l'assemblage et la structure du protéasome 26S.

Le complexe 20S est un empilement de quatre anneaux, organisés en une structure générale $\alpha\beta\beta\alpha$ et chaque anneau est composé de 7 monomères.

Le complexe 19S est constitué de deux "sous-complexes": la "base", composée en autres de 6 ATPases et le "couvercle".

2.2 Des éléments CIS et des facteurs TRANS spécifient le substrat.

2.2.1 Les éléments CIS, signaux de dégradation

Plusieurs éléments cis indiquent qu'une protéine doit être marquée pour être reconnue et dégradée par le protéasome 26S.

Le premier à rapporter à la "N-end-rule". Cette règle résulte de l'observation que différentes versions de β -galactosidases de *E. coli* fusionnées avec des protéines et exprimées dans la levure ont des stabilités différentes selon les acides aminés présents en N-terminus de la protéine. Cependant, des levures mutées dans le "pathway" de la "N-end-rule" ne présentent aucun phénotype apparent; ceci semble indiquer que ce signal de dégradation n'est pas impliqué dans des pathways de protéolyse vitaux (Bachmair *et al.*, 1986).

Un autre motif appelé "Destruction Box" (D Box) est présent dans d'autres protéines dégradées par le protéasome. Le consensus de ce motif réside en une séquence de neuf acides aminés, localisée dans la partie N-terminale : R(A/T)ALGx(I/V)(G/T)N.

Enfin, les séquences "PEST", sont constituées des régions riches en proline, acide glutamique, sérine et thréonine. La délétion de ce motif conduit à une stabilisation de la protéine.

2.2.2 Les facteurs TRANS, enzymes reconnaissant les substrats à dégrader

Les E3 ou ubiquitines ligases sont des protéines qui lient les substrats-cibles. Ce sont les E3 qui sont les acteurs dans la détermination de la haute spécificité du système.

Ciechanover (Ciechanover, 1998) propose une classification des ubiquitines ligases selon la nature du signal de dégradation.

La première famille couvre les E3 proprement dites, subdivisées en E3 α et β . Les E3 α sont capables de reconnaître de substrats ayant un signal "N-end-rule", dont le motif n'est pas encore caractérisé. E3 β est une enzyme similaire dont les cibles sont des petites protéines à extrémité N-terminale non-chargées.

La deuxième famille représente les E3 caractérisées par le motif "HECT" pour "Homologous to E6-AP C-Terminus". Un grand nombre de protéines caractérisées par un tel domaine a été isolé chez les eucaryotes supérieurs (Huibregtse *et al.*, 1995). Le domaine C-terminal, qui porte le résidu cystéine, un point d'ancrage des ubiquitines, est très conservé, tandis que la région N-terminale est plus variable et est sans doute impliquée dans la reconnaissance du substrat. Cette famille de E3 lie l'ubiquitine avant de la transférer sur le substrat (Nuber *et al.*, 1996).

Le troisième groupe de E3 est un complexe multiprotéique de 1,7 Md appelé APC (pour Anaphase Promoting Factor) ou cyclosome. Il participe à la dégradation de protéines possédant un domaine "Destruction Box", entre autres des cyclines mitotiques. Ce complexe comprend au moins 8 à 12 protéines dont une appartient à la famille des cullines (Apc2) et une autre, Apc11, est homologue à Rbx1⁽¹⁾. Le recrutement des substrats est médié par un activateur caractérisé par un motif d'interaction protéine-protéine WD40 (par exemple Cdc20, Cdh1). L'activité de l'APC varie durant le cycle cellulaire. Des études biochimiques chez *Xenopus* et *S. cerevisiae* montrent que l'APC lui-même est activé à l'anaphase et inactivé en phase G1 par un simple système ON-OFF (revue de Wolf and Jackson, 1998).

La quatrième E3, aussi composé d'un complexe multiprotéique, est appelée SCF. Nous en parlons plus en détail dans le point ci-dessous.

2.2.3 Les SCF

Cette ubiquitine-ligase est un complexe multiprotéique constitué de trois protéines (Skp1, une protéine de la famille des Cullines, et une protéine à motif F-box) (Bai *et al.*, 1996; Skowrya *et al.*, 1997). A ce complexe SCF, deux protéines ont récemment été ajoutées, Sgt1 et Rbx1. La figure 6 représente un modèle d'organisation du complexe SCF.

Ce complexe s'articule sur la protéine Skp1, très conservée au sein des eucaryotes. Elle permet de recruter, via le motif F-box, la protéine qui spécifiera le substrat-cible. Skp1 est la protéine "pont" entre la protéine à F-box et la culline. A l'heure actuelle, on ne lui connaît aucun rôle catalytique propre.

Les protéines à F-box doivent leur nom au motif F-box, découvert chez la cycline F humaine. La F-box est impliquée dans l'interaction avec Skp1. Ce motif a une séquence peptidique dont le consensus a été premièrement établi sur la comparaison de séquences de quelques protéines à F-box de *S. cerevisiae* et de l'homme : LPFEISLKIFNYLQFEDIINSLGVSQNWKNKIR KSTSLWKKL. Cette séquence a depuis lors été revue en un consensus plus lâche:

```
LP*****EIlLl*IlsyL***D*****L*rcs* VCR*W*La***d**LWr
i      dvvv viafv e      i qaa isk f vc e vfk
      iim lfcw      v kc th it iyq
      mm m h h
```

Les lettres majuscules indiquent les résidus identiques et les lettres minuscules correspondent au résidus similaires. Ce consensus est basé sur l'alignement de 29 protéines à F-box identifiées chez l'homme (Cenciarelli *et al.*, 1999).

Les protéines à F-box sont impliquées dans la reconnaissance spécifique des substrats à dégrader. En effet, elles possèdent des domaines impliqués dans des interactions protéiques comme un domaine de répétitions WD 40 (par exemple la protéine ScCdc4 (Bai *et al.*, 1996)), ou un domaine riche en répétitions de leucine (par exemple la protéine ScGrr1)(Li and Johnston, 1997).

La culline (par exemple Cdc53 chez *S. cerevisiae*, Pcu1 chez *S. pombe*) est une protéine issue d'une famille conservée dont la première fut découverte chez le ver *Caenorhabditis elegans*

⁽¹⁾ Rbx1 est une protéine à "Ring Finger" qui fait partie du SCF, voir point 2.2.3

(Kipreos *et al.*, 1996). Différentes expériences dont des études de délétion du domaine N-terminal de la culline de *S. cerevisiae* Cdc53 et de la culline humaine Cull1 montrent que celui-ci est impliqué dans la liaison avec Skp1 (Ohta *et al.*, 1999; Patton *et al.*, 1998). Un autre domaine (CH domain) interne est important pour la liaison avec Rbx1 et l'enzyme E2 (Cdc34). Apparemment, la culline ScCdc53 a pour rôle de fixer E2, et ainsi de la rapprocher du substrat à polyubiquitinyler.

Récemment, deux nouvelles protéines ont été associées à ce complexe SCF: Sgt1 (pour Suppressor of G2 allele of *skp1*) et Rbx1 (pour Ring Box protein). La délétion de ces deux gènes est létale pour la cellule. Rbx1 est une protéine montrant un motif en "RING finger" et est impliquée dans des interactions protéiques, notamment avec une E2, Cdc34. Dans le SCF, Rbx1 est liée de manière physique à la protéine à F-box et à la culline (Skowyra *et al.*, 1999). En recrutant E2, cette protéine augmente la vitesse d'ubiquitinylation du substrat. Rbx1 est à l'origine d'une classification modifiée des E3. D'une part, il y a les E3 qui exigent une protéine à Ring-box (SCF, APC et E3 proprement dites) et, d'autre part, les E3 fonctionnant sans cette protéine, à savoir les E3 à domaine HECT.

Sgt1, bien qu'elle ne soit pas impliquée dans la structure du CBF3 et du SCF, interagit avec Skp1. Le mutant *sgt1-5* présente un défaut d'ubiquitinylation de Cln1⁽¹⁾, normalement dégradée par le SCF^{Grr1}. De plus, dans ce même mutant, la protéine Sic1, normalement dégradée par le SCF^{Cdc4}, est également stabilisée. Ceci suggère que Sgt1 a un rôle dans la fonction du SCF. Cependant, on n'a pas encore établi son rôle au sein du "pathway" de l'ubiquitinylation (Kitagawa *et al.*, 1999).

2.3 Un exemple particulier de régulation protéolytique : le rôle du SCF dans le cycle cellulaire

Chez *Schizosaccharomyces pombe*, la protéine Rum1 est un inhibiteur de CDK (ou CKI) agissant sur les complexes CDK's Cdc2/Cdc13 et Cdc2/Cig2 (Moreno and Nurse, 1994). La fonction principale de Rum1 consiste en l'arrêt en phase G1 suite à une perception de phéromones (Stern and Nurse, 1998). La concentration cellulaire de Rum1 est strictement régulée de manière dépendante du cycle cellulaire. La protéine Rum1 est recrutée par la protéine à F-box Pop1 via les motifs d'interaction protéine-protéine WD40. Le complexe multiprotéique SCF^{Pop1} conduira à l'ubiquitinylation de Rum1 et à sa dégradation par le protéasome 26S (Kominami and Toda, 1997). Cette protéolyse permet, entre autres, de lever une inhibition du complexe Cdc2/Cdc13. Cependant, la cellule n'entrera en phase M que lorsque ce complexe CDK sera activé par la phosphatase Cdc25 (Hutchison and Glover, 1995).

⁽¹⁾ Cln1 est une cycline intervenant en phase G1 chez *S. cerevisiae*.

Objectifs

Objectifs du travail

La protéine Skp1 intervient dans deux complexes, comme nous l'avons décrit dans l'introduction.

Le premier est le kinétochore, un complexe multiprotéique se liant à l'ADN centromérique impliqué dans la ségrégation des chromatides sœurs pendant la mitose. La protéine Skp1 pourrait être essentielle pour l'activation de CBF3, le complexe se liant à CDEIII, et donc du kinétochore.

Le second est le complexe SCF (pour Skp1, Culline, protéine à F-box + Rbx1). Ce complexe est une ubiquitine ligase, c'est-à-dire qu'il va permettre la fixation de l'ubiquitine sur un substrat spécifique destiné à la dégradation. Le SCF recrute d'une part, le substrat-cible lui-même via la protéine à F-box et d'autre part, l'enzyme E2 (ubiquitin conjugating enzyme) via la culline et Rbx1. La protéine Skp1, dans ce complexe, constitue l'articulation entre la protéine à F-box et la culline.

Bien que des arguments plaident pour la conservation de cette situation chez les eucaryotes, le gène *skp1* de *S. pombe* ne complémente pas le phénotype thermosensible de deux allèles mutés de *SKP1* chez *S. cerevisiae*.

La question se pose donc de comprendre le ou les rôles joués par Skp1 à ces deux niveaux chez *S. pombe*. Dans ce but, l'identification de partenaires interagissant avec Skp1 est primordiale.

Notre travail va consister à effectuer un crible double-hybride d'une banque d'ADNc de la levure *S. pombe*, dans le but de découvrir des partenaires physiques de la protéine Skp1.

Résultats

Comme schématisé aux figures 2 et 6 de l'introduction, Skp1 est une protéine « pont » dans deux complexes jouant un rôle-clé dans des “pathways” de régulation du métabolisme et du cycle cellulaire. Skp1 est une protéine du CBF3 participant à l'activation du kinétochore chez *S. cerevisiae*. Par contre, chez *S. pombe* sa fonction dans le kinétochore et dans le SCF n'a pas été clairement mis au jour.

Notre objectif est donc de rechercher des partenaires physiques de la protéine Skp1 de *S. pombe*. L'outil que nous adoptons est la technique du crible double-hybride.

1 Principe, confection des outils et mise en oeuvre du crible double-hybride

1.1 Définition et particularités du système double-hybride (Fields and Song, 1989)

Le système double-hybride est une technique utilisée *in vivo* pour découvrir des partenaires physiques potentiels d'une protéine. Le concept est basé sur le fait que le facteur de transcription Gal4 possède deux domaines distincts, le domaine responsable de la liaison à l'ADN, le “Binding Domain” ou BD, et le domaine responsable de l'activation de la transcription, l’“Activating Domain” ou AD. En créant deux protéines “hybrides” ou de fusion, entre d'une part, le BD de Gal4 et une protéine X (“l'appât”), et, d'autre part, l'AD de Gal4 et une protéine Y (“la proie”), on peut reconstituer un activateur transcriptionnel fonctionnel, lorsque X et Y interagissent physiquement. Cette interaction sera décelée *in vivo* dans la levure grâce à l'activation de gènes rapporteurs, ou “mouchards”, placés sous le contrôle des séquences promotrices reconnues par Gal4.

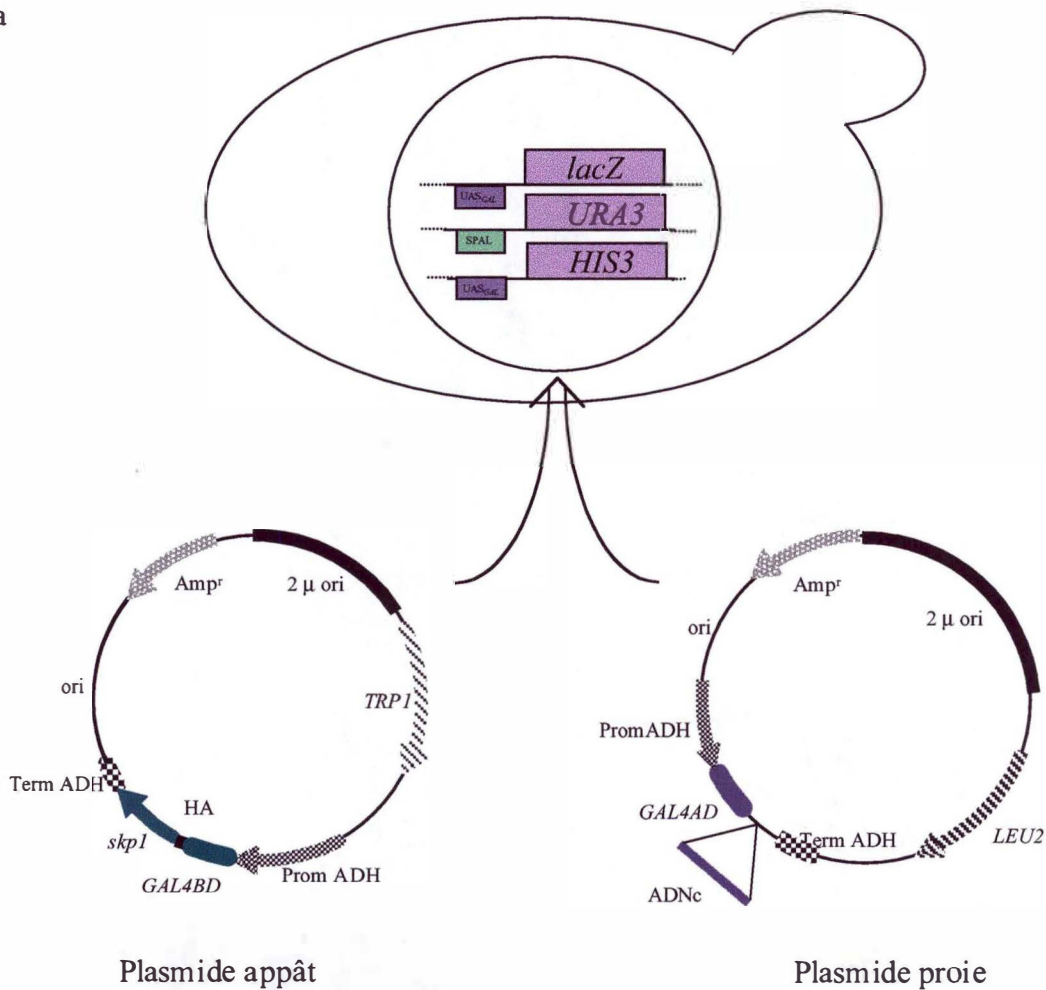
Une variante de ce système consiste à tester ou à vérifier non pas une interaction entre les protéines X et Y, mais d'identifier l'ensemble des protéines d'une banque d'expression interagissant avec la protéine X. Cette technique est appelée le crible double-hybride.

Dans le système que nous avons mis en oeuvre (schématisé en figure1), le plasmide appât (pAS1, pDH1) permet l'expression de la fusion Gal4BD-Skp1 et la sélection dans les souches hôtes MAV103 et MAV203. Le plasmide proie (pACTII) permet l'expression des protéines de fusion Gal4AD-Y, Y étant les ADNc d'une banque de *S. pombe*. Les deux plasmides sont co-transformés dans une souche de levure *Saccharomyces cerevisiae*, MAV103 ou MAV203, conçue pour réaliser ce crible double-hybride.

Les gènes rapporteurs utilisés ici sont deux gènes levuriens *HIS3* et *URA3* et le gène *lacZ* de *E.coli*. Les deux premiers gènes restaurent la prototrophie de la souche sur milieu sans histidine et sans uracile. *lacZ* encode la β -galactosidase, une enzyme qui clive le X-Gal libérant un chromophore bleu (figure 1b).

La région promotrice du gène rapporteur *HIS3* a été remplacée par des UAS_{GAL} , région promotrice reconnue par le Gal4BD.

1a



1b

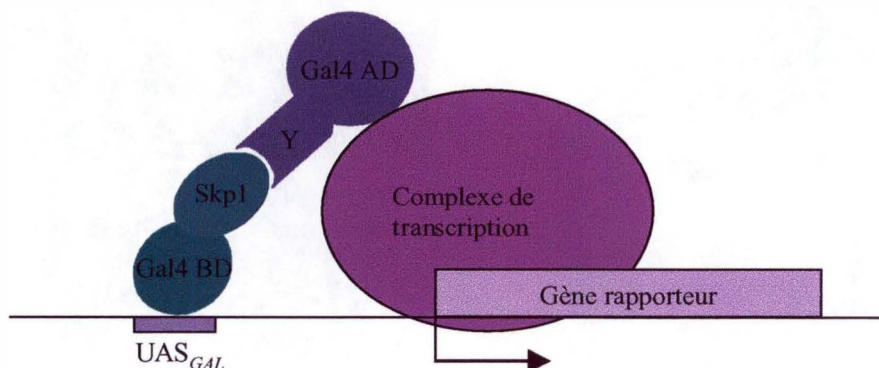


Figure 1: schéma représentant le principe du crible double-hybride utilisant le système Gal 4.

1a. La souche de *S. cerevisiae* possède des séquences promotrices UAS_{GAL} en amont des gènes *LEU2* et *lacZ*, et une séquence promotrice SPAL (voir texte) en amont du gène rapporteur *URA3*. Le plasmide appât encode une protéine de fusion Gal4BD Skp1 et le plasmide proie encode une protéine Gal4AD en fusion avec une séquence peptidique définie par un insert d'ADNc de *S. pombe*.

1b. L'expression d'un gène rapporteur (dans notre cas, *HIS3*, *URA3* et *lacZ*) est activée par le facteur de transcription Gal4, reconstitué grâce à l'interaction physique entre Skp1 et une protéine notée Y. En visualisant les colonies qui expriment les gènes rapporteurs (clones poussant sur un milieu sans histidine et sans uracile, et colorant en présence de X-Gal), on déduit qu'elles ont exprimé une protéine de fusion qui interagit avec Skp1.

Le gène de *E. coli*, *lacZ* a été intégré dans le génome de la levure. Il possède les mêmes régions promotrices UAS_{GAL}.

L'expression du gène rapporteur *URA3* est contrôlée par un "SPAL". Ce promoteur contient des UAS_{GAL} couplées à une URS, *SPO13*. Cette dernière région promotrice réprime l'expression de gènes impliqués dans la sporulation en conditions normales de croissance. Le promoteur chimère "SPAL" diminue de manière très importante l'expression basale du gène *URA3*, et permet de ce fait un criblage à sensibilité plus élevée que le promoteur UAS_{GAL}.

1.2 Construction et vérification des outils

1.2.1 Les souches de levure utilisées : MAV103 et MAV203

Nous possédons deux souches MAV103 et MAV203 construites par M. Vidal (Vidal *et al.*, 1996) pour réaliser des cribles double-hybride. Leurs caractéristiques sont décrites au point "Souches et Plasmides" du chapitre Matériels et Méthodes. Nous nous proposons de tester ces deux souches avec nos constructions appâts, préalablement au crible proprement dit, afin de retenir celle qui, dans nos conditions, paraît la "meilleure".

1.2.2 Plasmide appât "multicopy"

1.2.2.1 Construction

Les différentes étapes de la construction sont illustrées par la figure 2.

La séquence du gène *skp1* de *S. pombe* a été amplifiée à partir du plasmide pRS306-*skp1* par PCR avec des amorces à extrémités flottantes. Celles-ci permettent l'insertion de sites de restriction en amont (*NcoI*, *SalI*, *BamHI*, *EcoRI*) et en aval (*SmaI*, *XhoI*) de l'amplicon. La figure 2b représente schématiquement la région d'hybridation des amorces sur le pRS306 portant la séquence de *skp1*. L'amplicon a été restreint en *NcoI/XhoI* et le plasmide pAS1, représenté à la figure 2a, a été restreint en *NcoI/SalI*. Ensuite, les deux fragments ont été récupérés après migration sur gel d'agarose (voir figure 2c), purifiés par le kit "MBI Fermentas" et "ligués" par l'action de la T4 DNA ligase. La carte du plasmide pAS1-*skp1* est représentée en figure 2d.

Après transformation dans *E. coli*, des restrictions diagnostiques (*EcoRV*, *NdeI*) (voir la figure 2e), et des PCR diagnostiques (figure 2f) ont été réalisées sur des minipréparations d'ADN afin de contrôler la construction. Cette première étape de vérification franchie, l'insert *skp1* a été séquencé pour contrôler que la PCR n'a pas engendré des mutations et pour vérifier que le gène est en fusion traductionnelle avec Gal4BD.

Nous avons construit un plasmide permettant d'exprimer, sous le contrôle du promoteur constitutif de l'*ADH*, la protéine de fusion Gal4BD-Skp1. L'étape suivante consiste à vérifier l'expression de cette protéine dans la levure *S. cerevisiae*.

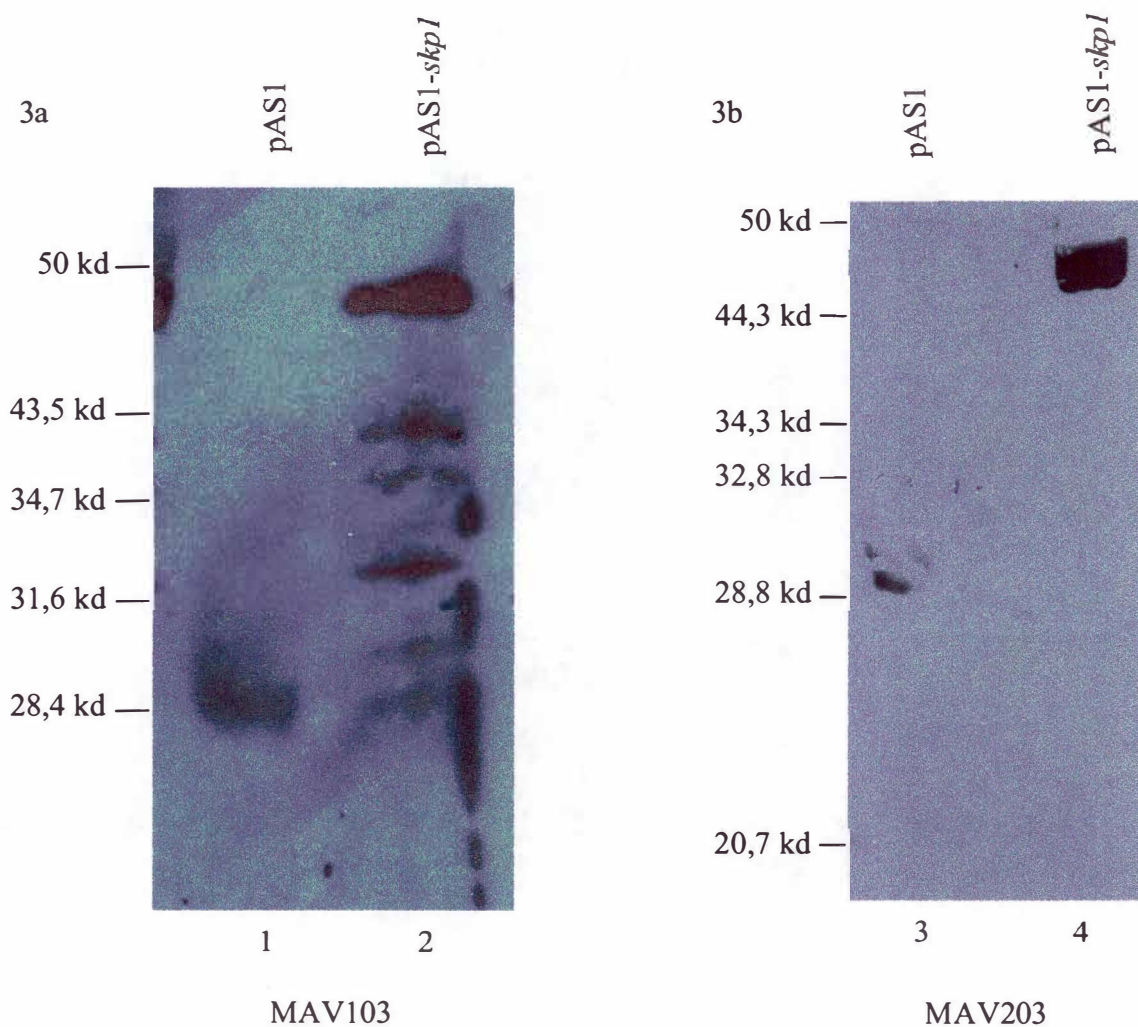


Figure 3: autoradiographie de deux Western-Blots.

Des extraits protéiques de deux souches (MAV103 et MAV203) furent déposées sur gel de polyacrylamide. Ces souches ont été transformées par le plasmide pAS1 seul (pistes 1 et 3) ou par le plasmide pAS1-*skp1* (pistes 2 et 4). Après transfert sur membrane, les extraits protéiques furent détectés par des anticorps dirigés contre l'épitope HA.

Les bandes détectées à 29 kD (pistes 1 et 3) et à 48 kD (pistes 2 et 4) correspondent respectivement à la protéine Gal4BD-HA et à Gal4BD-HA-Skp1.

1.2.2.2 Vérification de l'expression de la fusion Gal4BD-HA-Skp1

Nous avons testé l'expression de la protéine de fusion Gal4BD-Skp1 par la technique du Western-Blot. En C-terminal du domaine de liaison de Gal4, l'épitope HA⁽¹⁾ a été fusionné en phase. La protéine exprimée au départ de ce plasmide est donc Gal4BD-HA-Skp1. La première étape consiste à faire migrer des extraits protéiques de la souche transformée par le plasmide sur un gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE). Après un transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose, celle-ci est mise en présence d'anticorps monoclonaux de souris dirigés contre l'épitope HA. L'étape suivante consiste à mettre en présence des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires de souris, couplés à la peroxydase, une enzyme qui émet de la lumière en présence d'H₂O₂ et d'un composé chémoluminescent, le luminol. La membrane est alors révélée sur film photographique.

Nous constatons à la figure 3 que la protéine de fusion Gal4BD-HA-Skp1 est correctement exprimée dans les souches MAV103 et MAV203.

Au niveau de la piste chargée par des extraits protéiques de la souche MAV103 transformée par le pAS1-*skp1* (figure 3b, piste2), on voit une bande à 48 kd, correspondant à la protéine de fusion Gal4BD-HA-Skp1. D'autres bandes, à des tailles inférieures à 48 kd, sont visibles. Dans la piste voisine, correspondant à un extrait protéique de la souche n'exprimant que Gal4BD-HA, ces bandes ne sont pas détectées. Cela suggère qu'il pourrait s'agir de produits modifiés de la protéine de fusion (dégradation, phosphorylation, etc...).

1.2.2.3 Vérification de l'absence de transactivation basale des trois gènes rapporteurs

Les candidats potentiels du crible double-hybride sont détectés sur des milieux de sélection. Ces milieux sélectionneront les cellules possédant un insert Y dont la protéine encodée interagit avec Skp1, permettant ainsi le recrutement du complexe transcriptionnel par la protéine Y-Gal4AD et l'expression des gènes rapporteurs. Il est nécessaire de vérifier que la protéine Gal4BD-HA-Skp1 seule n'est pas suffisante pour recruter Gal4AD et induire une activation basale des gènes rapporteurs (*HIS3*, *URA3* et *lacZ*).

La figure 4 présente les photos des boîtes sur lesquelles les tests ont été effectués. Nous avons testé la croissance en stries sur différents milieux rapporteurs des deux souches MAV103 et MAV203, transformées soit par le pAS1 seul, soit pAS1-*skp1*⁽²⁾. Le contrôle positif est la souche MAV103 exprimant les protéines Gal4BD-C11 et Gal4AD-C128, deux sous-unités de la PolIII. L'interaction est avérée dans le même système (Flores *et al.*, 1999).

Nous avons testé la croissance des levures :

- sur SD-W-L-H⁽³⁾ avec un taux croissant de concentration en tri-aminotriazole (3-AT). Cette molécule est un inhibiteur compétitif de l'enzyme encodée par le gène *HIS3* (l'imidazole glycérol-phosphate déhydratase) (Klopotowski and Wiater, 1965). Le niveau d'activation basale dû à Gal4BD-HA-Skp1, capable à elle seule d'assurer l'expression du

⁽¹⁾ L'épitope HA est une séquence de 10 aa, issue de l'hémagglutinine du virus *Influenza*.

⁽²⁾ La souche contient aussi le plasmide proie vide, pACTII pour restaurer la prototrophie pour la leucine.

⁽³⁾ C'est un milieu synthétique dont la source de carbone est le dextrose. Il contient les bases nucléotidiques et tous les acides aminés, exception faite du tryptophane, de la leucine et de l'histidine. Le symbole U représente l'uracile (cfr page suivante).

gène rapporteur *HIS3*, peut être ainsi évalué par la concentration de 3-AT nécessaire à éteindre cette transcription basale.

On voit que la souche MAV203 transformée par le pAS1-*skp1* a une transactivation basale très élevée puisque le 3-AT en concentration de 200mM n'inhibe pas la transactivation basale du gène *HIS3* par Gal4BD-HA-Skp1. Par contre, la souche MAV103 transformée par le plasmide pAS1-*skp1* a une transactivation basale plus basse. A partir des 50mM de 3-AT, elle présente un problème de croissance et à 100mM de 3-AT, elle ne pousse plus.

- sur SD-W-L-U.

On observe la croissance de la souche MAV203 sur ce milieu dépourvu d'uracile, ce qui signifie une transactivation basale de l'expression du gène *URA3* par Gal4BD-HA-Skp1. La souche MAV103 transformée par le plasmide pAS1-*skp1* ne pousse pas sur ce milieu déplété en uracile.

- sur SD-W-L, avec une surcouche contenant du X-Gal (voir le point Milieux de Culture dans Matériels et Méthodes).

La souche MAV203 transformée par le plasmide pAS1 seul est colorée mais cette coloration s'accroît pour la souche surexprimant Gal4BD-HA-Skp1. Par contre, la souche MAV103 exprimant Gal4BD-HA-Skp1 ou Gal4BD-HA ne colore pas.

En conclusion, la transactivation basale due au plasmide appât pAS1-*skp1* dans la souche MAV203 est présente pour les trois gènes rapporteurs. Cette transactivation est trop intense pour avoir un système de sélection fonctionnel utilisable durant le crible. La transactivation basale dans la souche MAV103 due au plasmide pAS1-*skp1* est moins importante.

Par ailleurs, nous avons observé que la souche MAV103 a une croissance en stries plus rapide que MAV203.

Compte tenu de la transactivation de base non négligeable encore observée avec MAV103, nous avons opté pour l'utilisation d'un plasmide à nombre réduit de copies, le plasmide pDH1. On espère ainsi diminuer encore l'expression et donc la transactivation de Gal4BD-Skp1. Ce vecteur possède le même promoteur ADH que le pAS1 mais a une origine de réplication ARS *CEN*. Cette origine de réplication stabilise le nombre de plasmides à quelques unités (une à cinq) par cellule.

1.2.3 Plasmide appât "low copy"

*1.2.3.1 Construction du plasmide appât pDH1-*skp1**

Les différentes étapes de la construction du pDH1-*skp1* sont résumées à la figure 5. Nous avons amplifié la séquence du gène *skp1* à partir du plasmide pAS1-*skp1* par PCR avec des amorces à extrémités flottantes portant les sites de restriction *SacI* et *EcoRV* pour l'amont et *SstI* et *NotI* pour l'aval. La figure 5b présente l'hybridation de ces amorces sur le pAS1-*skp1* et une photo de la migration de l'amplicon PCR sur gel d'agarose. L'amplicon est à une taille attendue d'environ 550 pb. Il a été restreint en *SacI* et *SstI*, de même que la matrice pDH1 (représentée à la figure 5a). Ensuite, les deux fragments ont été récupérés après migration sur

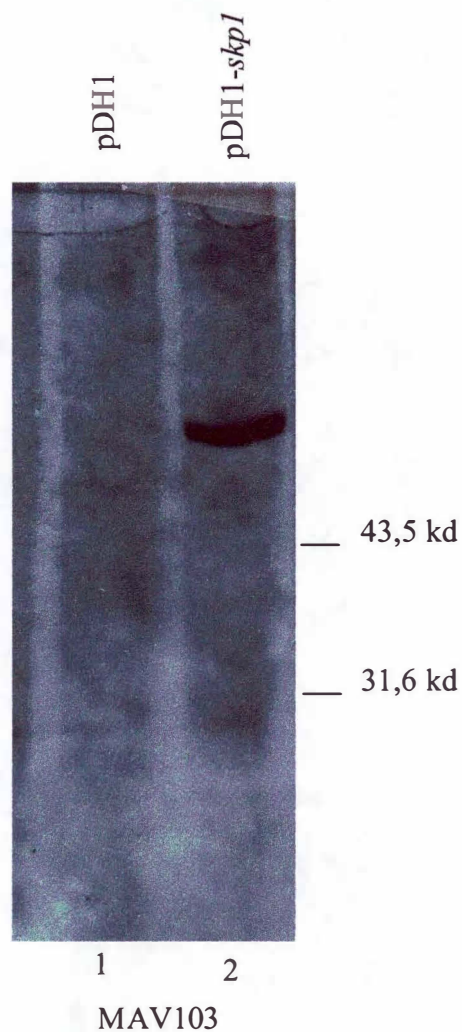


Figure 6: autoradiographie du Western-Blot analysant l'expression de la protéine de fusion Gal4BD-Skp1 dans la souche MAV103.

Les anticorps primaires utilisés sont des anticorps monoclonaux de souris dirigés contre Gal4BD. Sur cette autoradiographie, est visible une bande à 48 kd (comme à la figure 3b) correspondant à la taille attendue de la protéine hybride Gal4BD-Skp1.

gel d'agarose (voir figure 5c), purifiés par le kit " MBI Fermentas "et "ligués" par l'action de la T4 DNA ligase. La figure 5d représente la carte du pDH1-*skp1*.

Après transformation dans *E.coli*, des restrictions diagnostiques (*Sst*I et *Xho*I) (voir figure 5e) ont été réalisées sur des minipréparations d'ADN afin de contrôler la construction. L'insert a été séquencé afin de vérifier que *skp1* n'a pas subi de mutations lors de l'amplification par la réaction de PCR et également qu'il est en fusion traductionnelle avec Gal4BD.

Nous avons alors transformé la souche MAV103, et procédé comme précédemment.

1.2.3.2 Vérification de la fusion Gal4BD-Skp1

Nous avons testé l'expression de la protéine de fusion Gal4BD-Skp1 en effectuant un Western-Blot. Le plasmide pDH1 ne possédant pas la séquence de l'épitope HA, nous avons utilisé des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine Gal4BD.

La figure 6 représente l'autoradiographie du Western-Blot réalisé sur la souche MAV103 transformée soit par pDH1 (piste1), soit par pDH1-*skp1* (piste2).

La bande correspondant à la présence du peptide de 29 kd (domaine de liaison de Gal4) n'apparaît pas distinctement dans la piste 1, pour une raison qui n'est pas claire. Notons que l'expression de la fusion (Gal4BD-Skp1) et l'expression du domaine Gal4BD seul sont démontrées dans le système utilisé si on considère les résultats en figure 6 piste 2 (Gal4BD-Skp1) et en figure 3b piste 1 (Gal4BD dans MAV103).

Les résultats montrent que la construction Gal4BD-Skp1 est correctement exprimée dans la cellule.

1.2.3.3 Vérification de l'absence de transactivation basale des trois gènes rapporteurs

Nous avons comparé la croissance de la souche transformée⁽¹⁾ par le plasmide appât pDH1-*skp1* sur les différents milieux rapporteurs et la même souche transformée par le plasmide "high copy" pAS1-*skp1*, afin de tester la transactivation basale due à la protéine appât. Le contrôle positif est le même qu'utilisé dans les tests précédents: la souche MAV103 transformée par pAS1-*RPC11* et pACTII-*RPC128*.

La figure 7 présente les résultats obtenus.

On peut voir que la souche transformée par pDH1-*skp1* ne pousse plus à une concentration de 25 mM de 3-AT ; par contre la souche portant le plasmide pAS1-*skp1* pousse jusqu'à une concentration de 50 mM de 3-AT (croissance faible) et ne pousse plus du tout à une concentration de 100 mM.

Aucun des deux plasmides n'induit une croissance basale sur un milieu dépourvu d'uracile, ni n'induit de coloration en surcouche X-Gal.

Sur base de ces tests pilotes, les conditions de crible seront un milieu dépourvu d'histidine et contenant 100 mM de 3-AT dans le but d'éteindre le bruit de fond.

⁽¹⁾ Comme les tests précédents, MAV103 est transformée par le plasmide appât soit vide soit avec *skp1* et par le plasmide proie pACTII vide.

1.2.4 Vérification de la diversité de la banque d'ADNc de *S.pombe*

1.2.4.1 Description

La banque utilisée lors de crible double-hybride est une banque d'ADN complémentaire de *S. pombe*. En moyenne, 40% des gènes de *S. pombe* contiennent des introns définis par des sites d'épissage différents du consensus strict connu chez *S. cerevisiae*. Les inserts d'ADNc sont clonés en *XhoI* dans le plasmide pACT. Un "linker", dont la séquence est 5'-ATTTACC-3', a été ajouté au site *XhoI* permettant de construire des fusions traductionnelles de GalAD avec l'insert.

Cette banque a été construite par S. Elledge et fournie par B. Furnari. Elle a déjà permis, grâce à deux cribles double-hybrides, de cloner et de caractériser les protéines Pch1 et Orc2 (Furnari *et al.*, 1997; Leatherwood *et al.*, 1996).

1.2.4.2 Vérification de la diversité de la banque

Une vérification préliminaire de la diversité de la banque était nécessaire. En effet, la banque est amplifiée en bactéries. Les plasmides refermés sur eux-mêmes seront plus facilement répliqués que des plasmides contenant des inserts de plus grande taille. Par conséquent, les bactéries contenant les plasmides de petite taille ont un avantage sélectif sur les autres bactéries. Leur nombre relatif s'accroît lors de l'amplification de la banque et engendre un biais dans la représentativité des inserts de celle-ci.

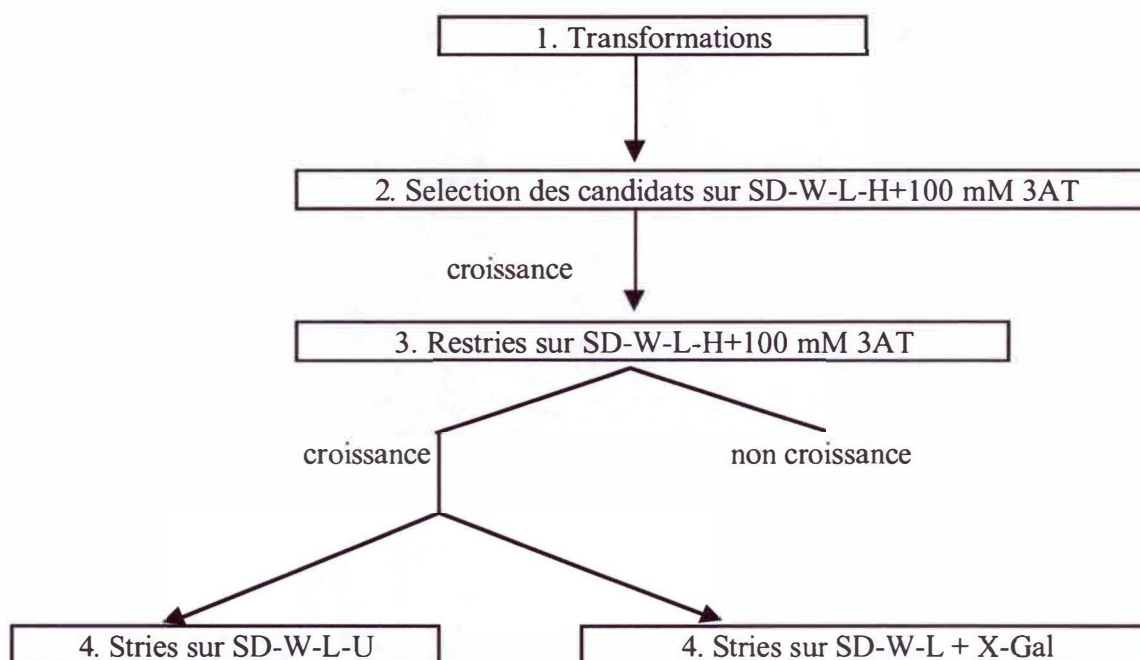
La figure 10 illustre les profils de restriction obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose. Les plasmides ont été restreints avec *HindIII*. Au vu de ces différentes bandes, nous pouvons dire qu'aucun plasmide n'est vide (par rapport à la migration de pACTII vide) et que le panel de profil de restriction est diversifié. Nous pouvons évaluer que la moyenne de taille des inserts est d'environ 1,5 kb.

1.3 Mise en oeuvre du crible double-hybride

Nous avons transformé la souche MAV103 pDH1-*skp1* par le plasmide proie pACT contenant les inserts d'ADNc de *S. pombe*. Nous avons réalisé 16 transformations avec, à chaque fois, 30 µg d'ADN de la banque, selon la procédure "TRAFO Scale-up" (Agatep *et al.*, 1998).

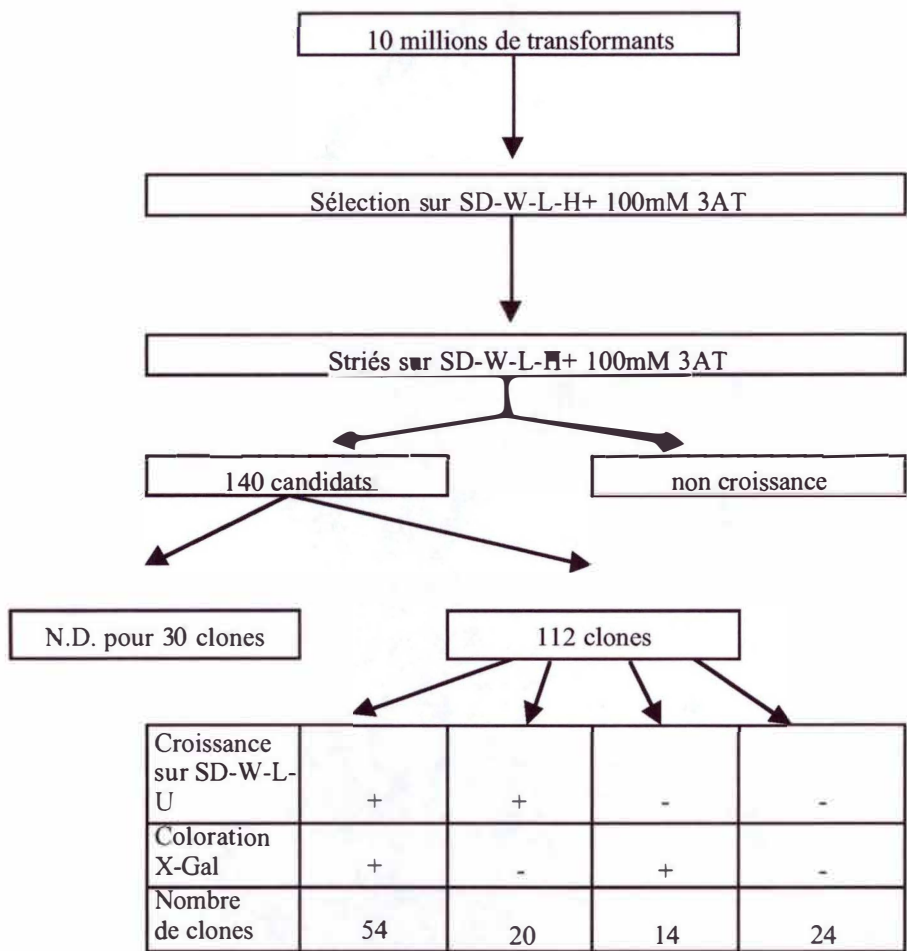
1.3.1 Déroulement du crible et des transformations

La procédure suivie est schématisée ci-dessous:



Nous n'écartons pas les clones qui ne sont positifs que pour le gène *HIS3*. Plusieurs exemples de protéines interagissant *in vivo* ne transactivent pas l'expression de chacun des trois gènes rapporteurs lorsqu'elles sont testées dans un système double-hybride. C'est le cas, par exemple, des protéines RB et E2F. Testées dans le système double-hybride, elles activent l'expression du gène *HIS3* et permettent une croissance en strie jusqu'à une concentration de 50 mM de 3-AT. Cependant, elles n'activent pas l'expression de *lacZ* (Vidal *et al.*, 1996). La transactivation du gène *URA3* n'est pas détectable sur un milieu déplété en uracile mais est révélée par l'ajout au milieu SD-W-L du FOA (acide 5-fluorouracile). Cette molécule est modifiée par l'orotidine décarboxylase, encodée par le gène *URA3*, en un composé toxique pour la cellule (Boeke *et al.*, 1984).

Nous avons criblé 10 millions de transformants lors de ce crible. 140 candidats ont été isolés. Les résultats de réponse des 140 candidats avec les différents rapporteurs sont présentés ci-dessous:



N.D. signifie non déterminé à ce jour.

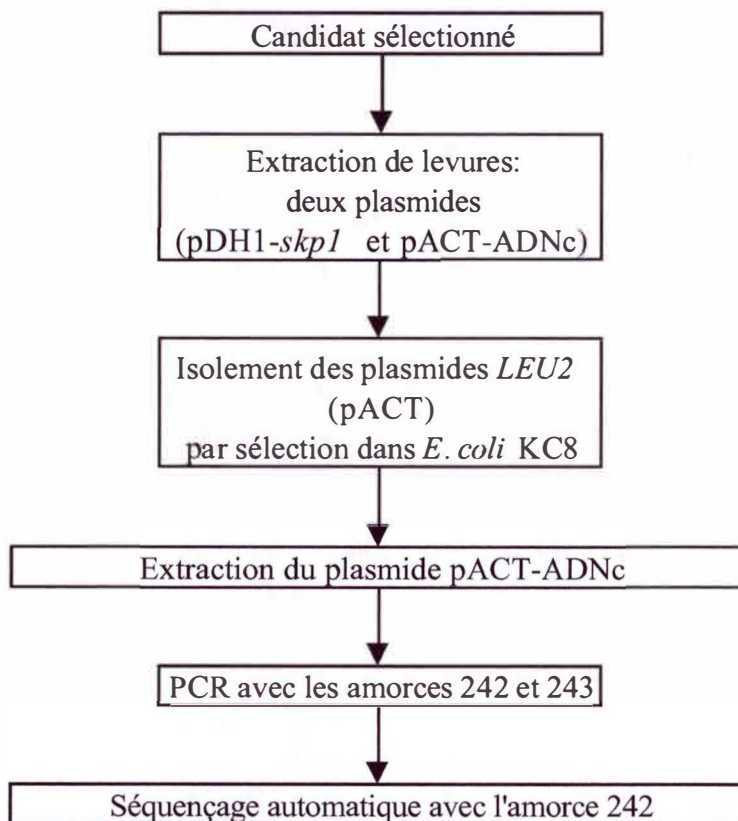
Nous avons classifié les différents candidats, de manière arbitraire, sur base de leur croissance sur milieu déplété en uracile et sur base de l'intensité de la coloration. La figure 9 représente une photo prise d'une boîte (SD-W-L + X-Gal) sur laquelle sont représentées les différentes intensités de coloration, ainsi que la convention de classification.

Parmi ces 140 partenaires potentiels, nous avons choisi de séquencer 16 candidats activant l'expression de chacun des trois gènes rapporteurs.

2 Analyse des 16 premiers candidats

2.1 Procédure d'identification des clones candidats

Le schéma ci-dessous illustre les étapes d'identification des clones isolés lors du crible double-hybride. Les premières étapes de cette procédure vont permettre d'isoler spécifiquement les plasmides de la banque.



La souche KC8 permet la sélection du plasmide portant les inserts de la banque, le pACT. La souche KC8 est mutée dans le gène *leuB*, mais cette mutation est complétée par le gène levurien *LEU2* porté par le pACT. Les bactéries transformées par le pACT sont sélectionnées sur un milieu ne contenant pas de leucine.

La figure 10 présente le résultat de la PCR sur les 16 candidats. Nous avons amplifié la région recouvrant l'insert d'ADNc ainsi que les 100 dernières paires de bases de la séquence encodant le domaine Gal4AD au moyen des amorces 242 en amont (s'hybridant dans *GAL4AD*) et 243 en aval (s'hybridant au niveau du terminateur de l'*ADH*) de l'insert.

Nous avons séquencé les inserts, préalablement amplifiés par PCR. Le séquençage est effectué grâce à l'amorce "242 " et permet la lecture des cent dernières paires de bases du *GAL4AD*, la zone de fusion des deux séquences codantes et une partie de la séquence de l'ADNc. Ce séquençage permet de connaître la cadre de lecture de l'insert et de vérifier si l'ATG initiateur est présent.

2.2 Caractérisation des candidats

Nous avons soumis les différentes séquences obtenues au programme de recherche d'analogie de séquences BLAST-x (pour Basic Local Alignment Search Tool) (Altschul *et al.*, 1997). Ce système permet de traduire la séquence nucléotidique soumise dans les 6 phases de lecture et d'identifier des protéines présentant de l'homologie avec celles-ci. Le résultat du BLAST-x contre le protéome de *S. pombe* est résumé dans le tableau suivant :

Référence	Taille de l'insert (kb)	Nom des ORFs contenues dans l'insert	Phase	Numéro d'accension
A1	1,1	Ral2	+1	P15258
A3	1	Peptide de 76aa	+1	N.D. ⁽¹⁾
		Prot. hypothétique de 10,3 kd	+1	Q13751
A5	1	Peptide de 76aa	+1	N.D.
		Prot. hypothétique de 10,3 kd	+1	Q13751
A73	1	Peptide de 76aa	+1	N.D.
		Prot. hypothétique de 10,3 kd	+1	Q13751
B4	1,4	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
B5	2	Pop2	+1	Q14170
B8	1	Protéine ribosomale soB	-1	N.D.
		Peptide de 9 aa	+1	CAB92099.1
B10	1,4	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
B11	1,4	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
B12	1,4	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
B14	1,7	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
B15	1,7	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
B18	1,4	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
D1	1,4	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
F9	1,4	Prot. hypothétique de 49,6 kd	+1	Q10223
F18	0,8	Méthyltransférase	-3	T39194
		Peptide de 92 aa	+1	N.D.

La figure 11 représente les différentes phases de lecture possibles d'une séquence nucléotidique. Les protéines dont les cadres de lecture sont localisés sur le brin complémentaire sont considérées dans ce crible comme faux-positifs.

Les résultats seront commentés dans la discussion générale.

⁽¹⁾ ND signifie non-déterminé.

*Conclusions,
Discussion
générale,
Perspectives*

Conclusions et discussion générale

Le déroulement harmonieux du cycle cellulaire requiert une orchestration spatiale et temporelle de nombreux complexes multiprotéiques. Certains de ces complexes partagent des protéines en commun. C'est le cas, par exemple, de la protéine Skp1. Celle-ci appartient au complexe centromère/kinétochore intervenant dans la ségrégation des chromatides sœurs à l'anaphase. Elle se retrouve également dans un complexe appelé le SCF (pour Skp1, Culline, protéine à F-box) où elle sert de pont entre une enzyme E2, portant une ubiquitine, et une protéine qui doit être ubiquitinylée avant d'être reconnue et dégradée par le protéasome 26S.

L'élucidation de la fonction précise de cette protéine commune aux deux complexes cités passe par la recherche de ses partenaires physiques.

Un crible double-hybride constitue à cette fin une technique puissante puisqu'elle permet de tester un grand nombre de protéines pour leur interaction potentielle avec la cible choisie, ici Skp1.

Nous avons réalisé un crible double-hybride avec Skp1 comme appât vis-à-vis d'une banque d'ADNc de *S. pombe*. Parmi 10 millions de transformants criblés, 140 clones ont poussé sur un milieu sans histidine et additionné de 100mM de 3-AT, suite à l'activation du rapporteur *HIS3*. Parmi ces 140 candidats, 54 répondent positivement à deux autres gènes rapporteurs (*URA3* et *lacZ*). 34 répondent à l'un des deux seulement et 24 au seul gène rapporteur *HIS3*. 30 candidats du premier crible restent à tester avec les deux autres rapporteurs.

Nous avons choisi de caractériser par séquençage les inserts contenus dans les plasmides proies pour 16 candidats fournissant une réponse aux trois gènes rapporteurs. Ces données permettent de les classer selon un schéma inspiré de Fromont-Racine (Fromont-Racine *et al.*, 1997). Le premier critère consiste à distinguer si l'insert séquençé contient une ORF en phase. Si ce n'est pas le cas, le clone entre dans la première catégorie (I). S'il possède une ORF en phase, le deuxième critère consiste à les classer selon que l'ORF est retrouvée plusieurs fois et en clones indépendants. Ce critère correspond à la deuxième classe (II). Si la séquence, pêchée une fois, encode une ORF complète, le clone entre dans la troisième catégorie (III). Par contre, si elle encode une protéine partielle, elle entre dans la quatrième classe (IV).

Classe I.

Le clone B8 contient une ORF (encodant les 137 derniers aa d'une protéine ribosomale s0B de 287 aa) mais dans la phase « -1 ». Ceci la disqualifie comme protéine partenaire de Skp1. Le clone renferme également une séquence en phase traductionnelle avec *GAL4AD* encodant un nonapeptide.

Le clone F18 contient une ORF en phase « -3 », encodant les 200 premiers aa d'une méthyltransférase (plus précisément une méthyltétrahydroptéroyltriglutamate-homocystéine S-méthyltransférase (Eichel *et al.*, 1995) bien entendu non exprimé en fusion avec Gal4AD. Dans ce cas-ci, le seul fragment de l'insert nucléotidique en phase traductionnelle avec le domaine activateur de Gal4 encode un peptide de 92 aa avant l'apparition d'un STOP.

Une analyse par BLAST-x⁽¹⁾ de ces deux peptides des clones B8 et F18 (de 9 et 92 aa) ne révèle aucune homologie avec une ORF du protéome de *S. pombe*. Nous les considérons comme des faux positifs.

Du reste, il faut noter qu'un autre crible double-hybride du laboratoire utilisant la même banque d'ADNc de *S. pombe* avec comme appât la protéine Gal4BD-Pch1, a pêché le même peptide de 92 aa en phase traductionnelle fut pêché. Nous pouvons donc considérer ce clone comme étant un faux-positif.

Classe II.

Neuf clones représentent deux populations d'inserts encodant une même ORF. Il s'agit des clones B4, B10, B11, B12, B18, D1, F9 et B14, B15. Ces neuf séquences contiennent deux types d'inserts : les sept premiers contiennent un insert de 1,4 kb et les deux derniers un insert de 1,7 kb (voir figure 10b des résultats, présentant la taille des inserts amplifiés par PCR et analysé sur gel d'agarose).

La protéine encodée a une taille de 431 aa et les inserts couvrent toute la séquence codante de cette protéine, hormis les quatre premiers acides aminés. Cette protéine est identifiée comme une protéine hypothétique de « 49,6 kd » et n'a pas d'homologue connu chez *S. pombe* ni dans le protéome d'autres organismes.

Classe III.

Trois clones (A3, A5 et A73) entrent dans la catégorie III de la classification. En effet, ils contiennent un insert identique possédant une ORF encodant l'entièreté d'une protéine : il s'agit d'une protéine hypothétique « 10,3 kd » de 88 aa. Nous avons constaté que l'ORF ne débute pas juste après la fusion avec le *GAL4AD*, une séquence de 231 nucléotides les sépare. Ces nucléotides codent pour un peptide de 77 aa en phase traductionnelle. Cette séquence peptidique n'est pas décrite dans les banques de données comme une protéine.

Classe IV.

La dernière catégorie des clones reprend des inserts contenant une ORF partielle identifiée une seule fois dans les séquences obtenues.

Le clone A1 contient un insert dont 240 nucléotides encodent les 80 derniers aa de la protéine Ral2, qui a une taille de 611 aa. Elle est identifiée comme étant un activateur de la protéine Ras1, un homologue de la famille des RAS chez les mammifères. Ral2 serait un facteur d'échange de GTP/GDP (GEF) de Ras1 (Fukui, *et al.*, 1989). Ras1 se trouve à l'amont des deux voies de régulation chez les levures:

¹ Le protéome reprend l'ensemble des protéines connues et hypothétiques (c'est-à-dire encodées par une séquence commençant par un ATG et terminant par un codon STOP. Cependant, une ORF, *sensu stricto*, correspond à une séquence nucléotidique allant d'un codon STOP au codon STOP suivant. En ce sens, toute phase ouverte de lecture n'encode pas forcément une protéine, identifiée comme telle dans le protéome.

Un peptide en phase traductionnelle avec par exemple Gal4AD peut donc correspondre à ce type d'ORF et ne pas appartenir à une protéine du génome de *S. pombe*.

-la cascade des MAP kinases, qui régule la réponse induite par des phéromones. Cette voie de transduction est impliquée dans la conjugaison et la mitose (Wang *et al.*, 1991 ; Gilbreth *et al.*, 1996).

-la polarisation du cytosquelette durant le cycle cellulaire (Chang *et al.*, 1994 ; Jaquenoud *et al.*, 1998).

Le clone B5 (un insert de 2 kb) encode la protéine à F-box Sud1/Pop2. La séquence partielle obtenue couvre les aa 116 à 703 de la protéine (dont la taille est 703 aa). Cette région contient le motif F-box (acides aminés 235 à 284) et six répétitions WD40 (Kominami *et al.*, 98 ; Wolf *et al.*, 1999).

Cette protéine est impliquée dans la dégradation par une E3 ligase de la protéine Cdc18, un initiateur de la phase S chez *S. pombe*.

Ce dernier candidat demande une attention particulière. En effet, l'identification d'une protéine à F-box connue parmi ces 16 atteste de la validité du crible double-hybride avec *Sp Skp1* comme appât. De plus, il laisse entrevoir la possibilité d'isoler au sein du génome de *S. pombe* d'autres protéines à F-box. A l'heure actuelle, six protéines à F-box, dont Pop2/Sud1, ont été prédites chez *S. pombe in silico*. Pour l'une d'entre elles (Pop2), des expériences de co-immunoprécipitation ont confirmé l'interaction détectée en double-hybride (D. Wolf, communication personnelle).

Perspectives

Nos premiers résultats partiels suggèrent une interaction entre Skp1 et des protéines non-identifiées au sein des protéomes connus.

Pour chaque candidat, il importe de s'assurer de la spécificité de la réponse, c'est-à-dire qu'il n'y a pas une interaction avec Gal4BD seul. L'analyse se fera en testant à nouveau dans le système double-hybride le plasmide pACT portant l'insert d'ADNc avec le plasmide pDH1 seul, n'exprimant que Gal4BD.

Ceci vérifié, des approches complémentaires sont nécessaires pour éprouver la validité fonctionnelle des interactions révélées en double-hybride.

L'intérêt de la co-immunoprécipitation consiste dans le fait qu'elle identifie une interaction, par une autre voie, entre des protéines exprimées *in vivo* dans l'organisme d'origine, c'est-à-dire en situation normale (au niveau de la qualité et de la quantité).

Chaque gène candidat ainsi retenu donnera lieu à la création du mutant délétant correspondant, et à l'analyse de son phénotype, lequel sera instructif quant au rôle que ce gène exerce au sein de la cellule.

Matériel et méthodes

1 Solutions et tampons

1.1 Solutions

Solution-stock 3-AT

C'est une solution 2M. Peser 16,8 g de 3-AT que l'on dissout dans 100 ml d'eau distillée. Après dissolution, stériliser par filtration (filtres 0,2 µm).

Agarose

1% dans du TAE 1X, pour électrophorèse. Chauffer une minute au four à micro-ondes pour dissoudre l'agarose. Laisser refroidir et couler dans un support adéquat. Ajouter 6µl de bromure d'éthidium (2mg/ml) à la solution lorsque l'on coule le gel.

Alourdisseur pour gels d'agarose

		pour 10 ml
Bleu de bromophénol	0,25%	25 mg
EDTA	25 mM	0,5 ml EDTA 0,5 M
Glycérol	50%	5 ml
Eau distillée		4,5 ml

C'est une solution concentrée dix fois. Ajouter un dixième d'alourdisseur au volume de l'échantillon que l'on met sur gel.

Alourdisseur pour gels protéiques

		pour 10 ml
Glycérol	50%	5 ml
β-mercaptoéthanol	25%	2,5 ml
SDS 10%	50%	5 ml
Tris pH 6,8	312,5mM	3,125 ml d'une solution 1 M
Bleu de bromophénol	0,0006%	0,5 mg

Cette solution est concentrée cinq fois.

Antibiotiques

Ils sont tous aliquotés par ml et stockés à -20 °C.

Ampicilline 10% : 1 g/10 ml d'eau distillée.

Stériliser par filtration sur un filtre Millipore 0,22 µm. Lors de son utilisation, cette solution 10% doit être diluée 1000X c'est à dire 400 µl d'ampicilline 10% pour 400 ml de milieu LB.

Bradford

Solution-stock 5x à diluer et à filtrer.

Coomassie Brilliant Blue G250 (Sigma B1131)	100 mg
Ethanol	50 ml
H ₃ PO ₄	100 ml
Eau distillée	50 ml

Bromure d'éthidium

2 mg par ml d'eau distillée. Mettre 5 à 6µl de cette solution pour un gel de 80 ml.

dNTP 20mM

Le stock fourni par Eurogentec se compose du mélange des quatre nucléotides à une concentration de 20 µmoles/µl, chaque nucléotide étant à une concentration de 5 µmoles/µl. Lors de la PCR 4 µl de cette solution des quatre nucléotides est utilisée dans un volume total de 100 µl.

Glycérol 100%

Solution à autoclaver.

Pour stocks glycérols : 200 µl de glycérol et 800 µl de cellules.

Glycérol 10%

Solution à autoclaver, 10 ml de glycérol 100% dans 90 ml d'eau distillée.

Solution d'acétate de lithium 1M

La solution de LiAc est préparée et stockée à la concentration de 1,0 M dans l'eau distillée et est stérilisée par autoclave. La solution ne doit pas être mise à pH car celui-ci peut varier entre 8,4-8,9 pour les applications réalisées.

Solution d'acétate de lithium 10X

Dissoudre 10,2 g de LiAc dans 50 ml d'eau distillée. Ajuster le pH à 7,5 avec une solution d'acide acétique. Amener le volume à 100 ml d'eau distillée. La solution est stérilisée par autoclave.

Solution LiAc/TE

pour une solution de 70 ml :

TE 10X	7 ml
LiAc 10X	7 ml
Eau distillée	56 ml

Solution LiAc/TE/PEG

pour une solution de 5 ml :

TE 10X	0,5 ml
LiAc 10X	0,5 ml
PEG 50%	4 ml

Marqueurs de poids moléculaires pour gel d'agarose

Smartladder (Eurogentec)

La solution fournie est prête à l'emploi. Pour un gel, 5 µl de la solution sont utilisés. Cette solution est conservée à 4°C.

Taille	Concentration (totale = 720 ng)
10000 bp	100 ng
8000 bp	80 ng
6000 bp	60 ng
5000 bp	50 ng
4000 bp	40 ng
3000 bp	30 ng
2500 bp	25 ng
2000 bp	20 ng
1500 bp	15 ng
1000 bp	100 ng
800 bp	80 ng
600 bp	60 ng
400 bp	40 ng
200 bp	20 ng

PEG Polyéthylène glycol

Placer 50 g de PEG MW 3350 (Sigma) dans un berlin de 150 ml et ajouter 35 ml d'eau distillée.

Mélanger au moyen d'un barreau magnétique jusqu'à dissolution complète. Cela prend environ 30 minutes. Transférer la solution dans un cylindre gradué de 100 ml et rincer le berlin à l'aide d'une petite quantité d'eau distillée. Ajouter cela au cylindre gradué et amener la solution à un volume final de 100 ml. Mixer par inversion.

Autoclaver et stocker la solution dans une bouteille fermant correctement afin d'éviter l'évaporation de l'eau et donc l'augmentation de concentration du PEG. Une concentration en PEG plus élevée est néfaste pour l'efficacité de la transformation.

RNase A

La solution stock est à une concentration de 10 mg/ml d'eau distillée. La concentration souhaitée est de 1 mg/ml. Chauffer 20 minutes à 100°C afin d'inactiver les DNAases. On aliquote et on conserve à -20°C.

SDS 10%

10 g de SDS dans 100 ml d'eau distillée. Chauffer un peu la solution pour permettre une dissolution des cristaux de SDS.

Single-strand Carrier DNA

Peser 200 mg d'ADN de haut poids moléculaire (Deoxyribonucleic Acid Sodium Salt type III from Salmon Testes, Sigma D 1626) dans 100 ml de TE Buffer. Mixer vigoureusement avec un agitateur magnétique jusqu'à ce que tout soit dissout (environ 3 heures). Transvaser 10 à 12x le mélange à l'aide d'une seringue de 10 ml. Aliquoter le DNA par ml et le conserver à -20°C. Avant l'utilisation, la solution doit être bouillie pendant 5 minutes et ensuite rapidement placée sur glace.

5-bromo 4-chloro 3-indoyl, β -D galactopyranoside (X-Gal)

Solution 2% : dissoudre 2g/100ml de N, N-diméthylformamide. Stocker à -20°C.

1.2 Tampons

Tampon de Blocking

	Pour 100 ml
PBS 1x	100 ml
Tween 0,05%	50 μ l/100ml
Lait en poudre 5%	5 g/100ml

Tampon de ligation (5X)

Tris HCl pH 7,4	20 mM
MgCl ₂	10 mM
DTT (dithiothreitol)	10 mM
ATP	1 mM

Tampon de lyse pour la préparation d'ADN plasmidique de levure

EDTA pH 8	1 mM
SDS	1%
Triton X-100	2%
Na Cl	100mM
Tris HCl pH 8	10mM

Tampon N2

KCl	900 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N3

KCl	1150 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	6,3

Tampon N5

KCl	1000 mM
Tris/H ₃ PO ₄	100 mM
EtOH	15%
pH	8,5

Tampon de restriction (conservés à -20°C)

Tampons fournis par la firme BRL.

	Les différents tampons									
Composition (mM)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Tris HCl	50	50	50	20	10	50	50	20	*	100
MgCl ₂	10	10	10	5	8	6	10	10	**	10
NaCl	-	50	100	-	-	50	50	-	-	150
KCl	-	-	-	50	-	50	50	-	***	-
pH	8	8	8	7,4	8,2	7,4	8	7,4	7,9	7,6

* 20 mM tris-acétate

** 10 mM Mg-acétate

*** 50 mM K-acétate

Tampon « RIPA »

Tampon PBS pH7	10mM
Triton X-100	1 %
SDS	0,1%
EDTA	2mM
NaCl	150mM
Na ₂ F	50mM
PMSF(Phényl Methyl Sulfonate Fluoride)	1mM

Préparer la solution, qui peut être stockée à 4°C. Ajouter fraîchement le PMSF d'une solution 100mM (174mg dans 10 ml d'éthanol), c'est à dire 100 µl dans 10 ml du tampon RIPA.

Tampon S1/P1 RNAase

Resuspendre le culot de bactéries dans cette solution.

Tris HCL pH 8	50mM
EDTA	10mM
Rnase A	100µg/ml

Ce tampon permet d'éliminer l'ARN lors de la préparation d'ADN de bactéries.

TamponS2/P2

NaOH	200mM
SDS	1%

Ce tampon permet la lyse des bactéries lors de la préparation d'ADN.

TamponS3/P3

KAC 2,55 M à pH4,8

Ce troisième tampon favorise la précipitation des débris cellulaires et des protéines pendant la préparation d'ADN plasmidique de bactéries.

TAE 50X

	100ml
Tris HCl pH 8	40 mM
EDTA	0,002 M
Acide acétique glacial	51,7 ml

TE

à pH 8

	pour un litre
Tris HCl pH 8	10 mM
EDTA pH 8	1,0 mM

2 Milieux de culture

2.1 Bactéries.

Milieu LB (Luria Bertani)

		pour 400 ml
Tryptone	1%	4 g
NaCl	0,5%	2 g
Yeast extract	0,5%	2 g

Pour un milieu solide, il faut rajouter 2,5 % d'agar. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Pour préparer du milieu LB + ampicilline, on ajoute l'antibiotique lorsque la température du milieu est descendue sous 60°, car c'est un composé thermolabile. L'ampicilline est à une concentration-stock de 100mg/ml et elle est diluée 1000 x dans le milieu (400 µl pour 400 ml de milieu LB).

Les bactéries sont mises en culture à une température de 37°C, sous agitation pour les cultures liquides.

Milieu SOC

C'est une solution très riche en sels que l'on ajoute rapidement aux cellules ayant subi une décharge électrique lors d'une transformation par électroporation.

	Pour 500 ml
Tryptone	10 g
Yeast extract	2,5 g
NaCl	0,3 g
KCl	0,93 g
Mg SO4	1,01 g
Mg Cl2	1,23 g
Glucose	2 g
Eau distillée	495 ml

Stériliser par autoclave, et aliquoter en falcon 50 ml.

Milieu minimum : milieu à base de la solution saline M9

Milieu M9amp-Leu :

Solution 1 : 150 ml d'agar 3%, autoclavé.

Solution 2 :

	Pour 150 ml :
M9 20x	15 ml
Mix AA 10x	30 ml
Uracile 1%	1 ml
Tryptophane 1%	1 ml
Histidine 1%	1 ml
Dextrose 20%	3 ml
Thiamine 1M	0.3 ml

Mélanger les deux solutions (maintenir les solutions à 55°C), puis ajouter :

MgSO ₄ 1M	300µl
CaCl ₂ 0.1M	300µl
Ampicilline 100mg/ml	300µl

Couler sur boîtes de pétri. Le volume de milieu correspond à 12 boîtes.

Milieu M9 20x :

	Pour 100ml :
Na ₂ HPO ₄	12g
KH ₂ PO ₄	6g
NH ₄ Cl	2g
NaCl	1g

Porter à 100ml avec de l'eau distillée, puis stériliser par autoclave 20 minutes à 120°C.

2.2 Levures : *Saccharomyces cerevisiae*.

Milieu riche

Pour un litre de milieu YPD (Yeast Extract Dextrose) :

Dextrose	20 g
Peptone	20 g
Yeast Extract	10 g

Pour obtenir un milieu solide, ajouter 25 g d'agar (2,5%). Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée, puis mettre à pH 4,8 avec de l'HCl 37%. Amener la solution à un litre, ensuite autoclaver 20 minutes à 120°C.

Milieu minimum

Solution SD :

Bacto Yeast Nitrogen Base (w/o AA et NH ₄ SO ₄)	1,7 g
Ammonium sulfate	5 g
Dextrose 2%	20 g

Pour réaliser un milieu solide ajouter 25 g d'agar. Amener la solution à 900 ml avec de l'eau distillée. Autoclaver 20 minutes à 120°C.

Quand le milieu est refroidi (environ 60°C), ajouter 100 ml de mix d'AA 10 x.

Mix d'AA 10X :

Ce mix d'acides aminés et de bases est dépourvu de quatres éléments souvent employés comme marqueurs de sélection, à savoir l'uracile, l'histidine, la leucine et le tryptophane.

Dissoudre dans 800 ml d'eau distillée :

Adénine	0,3 g	Phénylalanine	0,6 g
Arginine	0,3 g	Proline	0,3 g
Aspartate	1,2 g	Sérine	4,0 g
Glutamate	1,0 g	Thréonine	2,0 g
Isoleucine	0,3 g	Tyrosine	0,6 g
Lysine	0,5 g	Valine	1,5 g
Méthionine	0,3 g		

Chauffer au micro-ondes quelques minutes pour tout dissoudre et amener à 1000 ml avec de l'eau distillée.

Volume à ajouter pour un litre de milieu :

Leucine 1%	5 ml
Histidine 1%	3 ml
Tryptophane 1%	3 ml
Uracile 1%	3 ml

Pour un milieu sans leucine, il faut rajouter tous les éléments exception faite de la leucine.

Remarques

- l'uracile précipite à température ambiante. Il faut la mettre au bain-marie quelques minutes pour dissoudre le précipité. On peut utiliser de l'uridine qui ne présente pas ce désavantage. Dans ce cas, il faut ajouter 8 ml d'une solution 100x (0,375g pour 100ml).
- Le tryptophane est une molécule sensible à la lumière ainsi qu'à la chaleur. La solution-stock est conservée à 4°C et emballée dans du papier aluminium.

Milieu SD-H + 3 AT

Le 3-amino triazole (SIGMA, A8056) permet d'éliminer le bruit de fond sur un milieu dépourvu d'histidine. Ce bruit de fond est dû à une transcription basale de l'appât.

Solution-stock de 2M : 16,8g de 3AT dans 100ml d'eau distillée. Dissoudre à l'aide d'un barreau magnétique, filtrer la solution (filtres de 0,22 μ m).

Coloration X-Gal pour levures

Préparer une solution d'agarose 1% (5ml par boîte). Le garder à 50°C.

Préparer une solution « K-PO₄ » 1M à pH7 (5ml par boîte). La placer à 50°C.

Mélanger l'agarose et la solution « K-PO₄ » + 0,1 ml de SDS 10% + 0,6 ml de DMF (N,N-Diméthylformamide) + 0,2 ml de X-Gal 2% dissous dans le DMF.

Verser le mélange sur la boîte, incuber quelques heures à 30°C.

Solution « K-PO₄ » :

K₂HPO₄ : 17,4g/100ml

KH₂PO₄ : 13,6g/100ml à autoclaver, 20 minutes à 120°C.

Pour 100ml d'une solution « K-PO₄ » 1M pH7, on prend 61,5ml de K₂HPO₄ et 38,5ml de KH₂PO₄.

Solution-stock X-Gal, 2% :

Peser 1g de X-Gal et le dissoudre dans 50 ml de DMF, aliquoter par un ml en eppendorfs.

Conserver à -20°C.

3 Souches et plasmides

3.1 Souches

3.1.1 Souches de levures : *Saccharomyces cerevisiae*

MAV103 (*MATa*, Δ *GAL4* Δ *GAL80*, *SPAL*₁₀ : :*URA3*, *GAL1-LacZ*, *GAL1-HIS3*, *ade2-101*, *ura3*, *leu2-3*, *lys2-801*, *trp1D63*).

Cette souche est utilisée pour des cribles double-hybride et on sélectionne les candidats positifs sur milieux exempts de tryptophane et leucine pour la sélection des plasmides proie et appât (pDH1 et pACT, voir ci-dessous), d'histidine, d'uracile et colorants en surcouche X-Gal (les trois gènes rapporteurs).

Cette souche a été construite par Marc Vidal, qui nous l'a fournie (Vidal *et al.*, 1996).

MAV203 (*MAT α* , Δ *GAL4* Δ *GAL80*, *SPAL*₁₀ : :*URA3*, *GAL1-LacZ*, *GAL1-HIS3*, *ade2-101*, *ura3*, *leu2-3*, *lys2-801*, *trp1D63*).

Cette souche possède la même génotype que MAV 103, mais de « mating type » opposé.

Cette souche a été construite par Marc Vidal (Vidal *et al.*, 1996) Cette souche nous a été fournie par Tomi Mäkelä (Haartman Institute, Helsinki, Finlande).

3.1.2 Souches de bactéries

DH10B (*F- mcrA*, Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*), ϕ 80*dlacZ* Δ *M15*, Δ *lacX74*, *deoR*, *recA1*, *endA1*, *araD139*, Δ (*ara*, *leu*)7697, *galU*, *galK*, λ^- , *rspL*, *nupG*).

Cette souche est utilisé pour faire des transformations par choc thermique. Elle est rendue compétente par un traitement préalable au CaCl_2 . On obtient une efficacité de transformation d'environ 10^6 transformants.

KC8 (*hsdR*, *leuB* 600, *trpC9830*, *pyrF* : :*Tn5*, *hisB463*, *lacDX74*, *stra*, *gal U*, *K*). Le transposon *Tn5* est porteur du gène conférant la résistance à la kanamycine.

Cette souche de *E.coli* est mutée dans les gènes *trpC*, *leuB* et *hisC*, mais ces mutations peuvent être restaurées par un complémentation hétérologue avec les gènes *TRP1*, *LEU2* et *HIS3* de *S.cerevisiae*. Nous avons transformé cette souche par électroporation.

Cette souche nous a été fournie par Tomi Mäkelä (Haartman Institute, Helsinki, Finlande).

3.2 Plasmides.

pAS1: ce vecteur est utilisé en tant que « plasmide-appât » dans un crible double hybride. Il possède comme gène de sélection chez la levure *TRP1*, et chez la bactérie le gène de résistance à l'ampicilline. Il contient une séquence 2 μ , lui permettant une répllication autonome dans la levure

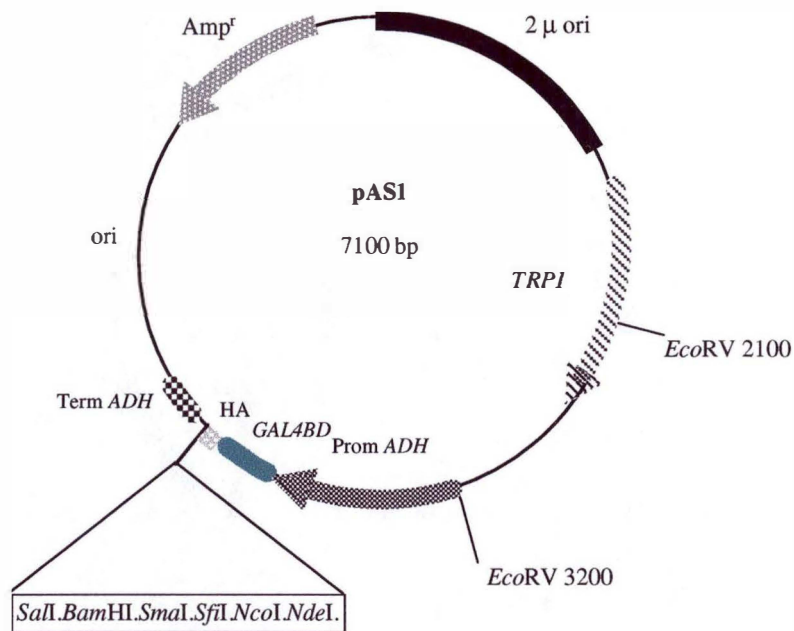


Figure 1: carte du plasmide pAS1, plasmide appât utilisé dans le crible double-hybride.

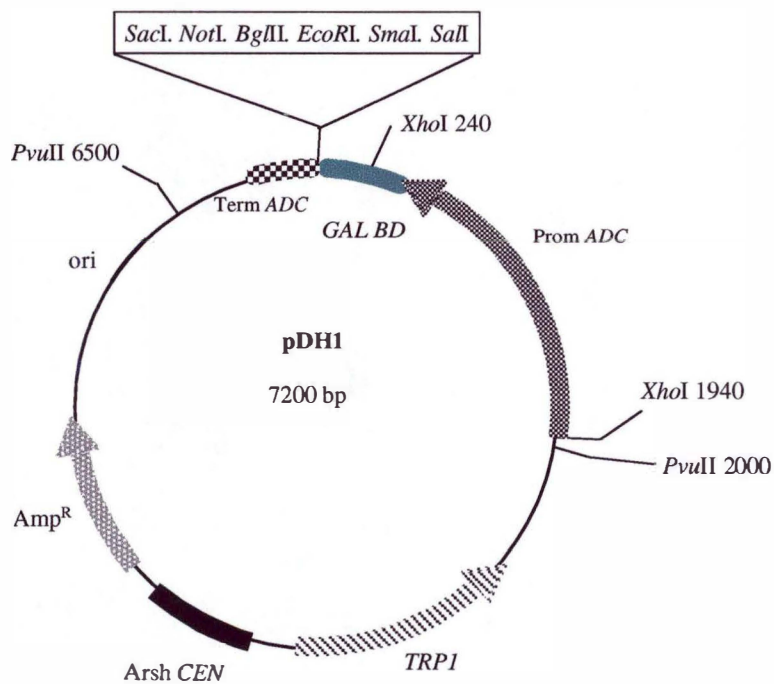


Figure 2: carte du plasmide pDH1, plasmide appât utilisé dans le crible double-hybride.

à un niveau élevé dans la cellule (15-40), et une ori afin de pouvoir se répliquer dans ses deux hôtes. Ce plasmide est doté d'un promoteur ADH qui permet l'expression du domaine se liant à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (*GAL4BD*) et d'un épitope de la protéine virale hémagglutinine, HA (*Influenza*), suivi d'un site multiple de clonage permettant la réalisation d'un gène de fusion entre *GAL4BD* et le gène d'intérêt. Ce plasmide a une taille de 7,1 kb. Il nous a été fourni par B. Furnari (The Scripps Research Institute, La Jolla, Californie) (Durfee *et al.*, 1993). (Figure 1)

pDH1: ce vecteur est utilisé en tant que « plasmide-appât » dans un crible double hybride. Il possède comme gène de sélection chez la levure *TRP1*, et chez la bactérie le gène de résistance à l'ampicilline. Il contient une séquence *ARS CEN* lui permettant une réplication autonome dans la levure mais à un niveau stable de 1 à 2 copies par cellule, et une ori afin de pouvoir se répliquer dans ses deux hôtes. Ce plasmide est doté d'un promoteur ADH qui permet l'expression du domaine se liant à l'ADN du facteur de transcription Gal4 (*GAL4BD*) suivi d'un site multiple de clonage permettant la réalisation d'un gène de fusion entre *GAL4BD* et le gène d'intérêt. Ce plasmide a une taille de 7 kb.

Ce plasmide provient des plasmides pPC97 et pPC86 (Durfee *et al.*, 1993). Tous deux ont été restreints par l'enzyme *PvuII*. Cette restriction a généré deux fragments et on a ligué le fragment contenant GalBD de pPC97 avec le fragment contenant les marqueurs *TRP1*, *Amp^r* et *ARSCEN* du plasmide pPC86. Le pPC97 et le pPC86 nous ont été fourni par M. Vidal. (Figure 2)

pACT: ce vecteur est utilisé en tant que « plasmide-proie » dans un crible double hybride. Il possède comme gène de sélection chez la levure *LEU2*, et chez la bactérie le gène de résistance à l'ampicilline. Il contient une séquence 2 μ ori, lui permettant une réplication autonome dans la levure, et une ori afin de pouvoir se répliquer dans la bactérie *E. coli*. Ce plasmide est doté d'un promoteur ADH qui permet l'expression du domaine transactivateur du facteur de transcription *GAL4* (*GAL4AD*). Ce plasmide a une taille de 7,65 kb. Il nous a été fourni par B. Furnari (The Scripps Research Institute, La Jolla, Californie) (Durfee *et al.*, 1993). (Figure 3).

pRS306 : ce vecteur présente les origines de réplication caractéristiques de *E. coli* et *S. cerevisiae*. Il présente deux types de marqueurs de sélection : un gène de résistance à l'ampicilline et *URA3*. (Figure 4)

3.3 Banque de cDNA.

La banque d'ADNc de *S.pombe* utilisée a été fournie par Beth Furnari (The Scripps Research Institute, La Jolla, Californie). Cette banque a été construite par S. Elledge. Les ADNc sélectionnés ont une taille supérieure à 600 pb et ont été clonés dans le pACT en *XhoI*, en fusion traductionnelle avec le domaine transactivateur de Gal4, grâce à l'ajout d'un « linker » de 8 nucléotides (Furnari *et al.*, 1997; Leatherwood *et al.*, 1996).

4 Techniques relatives aux protéines

4.1 Extraction des protéines de levures

4.1.1 Préparation d'extraits de protéines

Incuber la culture cellulaire dans 50 ml de milieu à 30°C jusqu'à ce qu'elle atteigne une DO de 0,250 soit environ $2,5 \times 10^8$ cellules.

Centrifuger la culture 5 minutes à 3000 rpm. Resuspendre le culot avec 5 ml de STOP Buffer froid et transférer dans un Falcon 15 ml. Le STOP Buffer arrête la croissance cellulaire. Centrifuger 5 minutes à 5000 rpm ; enlever le surnageant. Le culot peut être congelé à cette étape.

STOP buffer :

150mM NaCl

50mM NaF

10mM EDTA

1mM NaN₃ pH 8

l'azide de sodium (NaN₃) bloque la croissance bactérienne.

4.1.2 Dénaturation des extraits protéiques

Resuspendre le culot dans 20 µl de RIPA buffer. Ajouter 1,5 ml de billes de verre (0,5 mm de diamètre) et vortexer 1 minute. Plonger les échantillons dans de l'eau bouillante 3 minutes. Laver les billes avec 1 ml de RIPA buffer et centrifuger à 14 000 rpm 15 minutes à 4°C. Reprendre le surnageant et le transférer en eppendorf. Durant toutes ces étapes, les protéines doivent restées à froid.

RIPA buffer :

10mM sodium phosphate pH7

1% Triton X-100

0,1% SDS

2mM EDTA

150mM NaCl

50mM NaF

1mM PMSF(phényl Methyl Sulfonyl Fluoride), à ajouter dans un aliquot de la solution RIPA.

Le Triton X-100 et le SDS sont des détergents (déstabilisateurs de la membrane plasmique). Le NaF est un inhibiteur de phosphatases et le PMSF, quant à lui, inhibe les protéases. L'EDTA est un chélateur de métaux lourds.

PMSF (solution 100mM): 174 mg dans 10 ml éthanol 100%. A garder à 4°C.

4.1.3 Dosage des extraits protéiques par Bradford

Mettre 10 µl de l'échantillon dans une cuvette de 1 ml (pour spectrophotomètre) et y ajouter 990 µl de solution de Bradford. Recouvrir de papier parafilm et mélanger par inversion. Attendre 5 minutes et lire la densité optique à 595nm.

Solution stock 5X du Bradford :

	200ml
Coomassie Brilliant Blue G-250	0,1g
Ethanol	50 ml
H ₃ PO ₄ 85%	100 ml
Eau	50 ml

Courbe d'étalonnage :

Standard : BSA à 100µg/ml.

Après avoir laissé sur table 5 minutes, prendre la DO₅₉₅ de 0 ; 5 ; 10 ; 50 ; 100 ; 150 ; 200 µl de BSA complétée de Bradford pour arriver à 1 ml. Faire un graphe de la densité optique en fonction de la concentration de BSA.

Reporter les valeurs obtenues pour l'échantillon sur le graphe. On obtient alors la concentration en protéines de l'extrait.

4.2 Electrophorèse en gel polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

La figure 5a représente schématiquement une migration d'extraits protéiques en conditions dénaturantes.

4.2.1 Préparation du gel.

4.2.1.1 Le Running Gel, à 12% de polyacrylamide

	20 ml
Eau	6,6 ml
30% Acrylamide mix	8 ml
1,5M Tris (pH8,8)	5 ml
SDS 10%	0,2 ml
APS 10%	0,2 ml
TEMED	8 µl

Couler la solution entre les deux plaques de verre préalablement fixées sur leur support. Mettre 1ml d'eau à la P1000 au-dessus du gel, pour permettre la polymérisation de celui-ci (la présence d'air l'inhibe). Lorsque le gel est pris, enlever l'eau par inversion du montage.

4.2.1.2 *Le Stacking Gel*

	6 ml
Eau	3,3 ml
30% Acrylamide mix	1 ml
Tris 0,5 M pH6,8	1,5 ml
SDS 10%	0,06 ml
APS 10%	0,06 ml
TEMED	6 µl

Placer le peigne entre les deux plaques de verre avant de couler le Stacking gel. Le couler à la P 1000 jusqu'à ce que le liquide arrive au sommet des puits. Laisser polymériser puis retirer lentement le peigne. Remplir les puits avec le tampon d'électrophorèse (SDS-PAGE buffer 1x).

4.2.2 Préparation des échantillons

Il faut charger une quantité de 50 µg de protéines. Ce volume dépend de la concentration en protéines de l'extrait. De plus, il faut y ajouter un tampon de chargement protéique à base de bleu de bromophénol dont la concentration-stock est 5x.

On charge les échantillons à la pipette Hamilton. Un puits est pris par un marqueur de poids moléculaire (Bio Rad prestained SDS-PAGE standards low range) et un second par un marqueur colorimétrique (Bio Rad prestained SDS-PAGE standards kaléidoscope).

Tampon de chargement protéique 5X

	10 ml
Glycérol	5 ml
β-mercapto-éthanol	2,5 ml
SDS	1 g
Tris 312,5 mM pH6,8	3,125 ml d'une solution 1M
Bleu de Bromophénol	0,5 mg

4.2.3 Migration

On bloque l'appareil à 40 mA et le voltage peut varier jusqu'à un maximum de 600Volts. La durée de migration est fonction du pourcentage du gel et de la distance de séparation entre les différentes protéines du marqueur protéique.

4.3 Transfert sur membrane de nitrocellulose (Western-Blot)

Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose est un transfert de type semi-dry. On découpe une membrane de nitrocellulose aux dimensions du gel ainsi que 6 papiers Whatman. La membrane est humidifiée dans l'eau distillée tandis que les papiers Whatman sont humidifiés dans le tampon de transfert. La figure 5b représente schématiquement un transfert sur membrane de nitrocellulose.

On place le tout dans l'appareil de transfert (semi dry). Afin que le transfert des protéines soit optimal, l'ampérage doit varier entre 0,8 et 3mA par cm² de membrane de nitrocellulose. Le voltage doit varier entre 10 et maximum 14 V afin d'éviter de brûler les électrodes. La durée du transfert varie quant à elle entre 30 minutes et deux heures, en fonction de la taille des protéines à faire transférer (la vitesse de transfert des protéines dépend de leur poids moléculaire : plus le poids moléculaire est élevé, plus la vitesse de transfert est lente).

Tampon de transfert :

	pour 100 ml
Tris 48mM	580mg
Glycine 39mM	290mg
SDS 0,037%	37mg
Méthanol	200 ml
Eau distillée	porter à volume

Ensuite, la membrane est rincée dans de l'eau distillée. La qualité du transfert ainsi que celle du chargement en protéines des pistes peut être visualisée par une coloration au rouge ponceau. Le rouge ponceau colore non-spécifiquement les protéines sur la membrane de nitrocellulose. Cette coloration s'effectue par simple immersion de la membrane dans le colorant, suivie immédiatement par des rinçages à l'eau distillée afin d'ôter l'excédent de colorant. Cette coloration est ensuite éliminée par un rinçage au PBS 1X.

Ponceau 1X

Dissoudre 0,5g de Ponceau S dans 1 ml d'acide acétique glacial, amener à 100 ml avec de l'eau.

4.4 Immunodétection

Cette étape utilise une technique de révélation dite indirecte. Un anticorps primaire reconnaît son épitope et s'y fixe. C'est la reconnaissance spécifique du substrat. Un second anticorps est utilisé pour la révélation: il va reconnaître l'anticorps primaire et s'y fixer. Il est conjugué à la peroxydase, une enzyme qui va catalyser une réaction produisant de la lumière, qui sera captée sur un film autoradiographique.

La figure 5c représente très schématiquement l'immunodétection des protéines « taggées » par l'épitope HA, par des anticorps primaires reconnaissant cet épitope. Des anticorps secondaires dirigés contre les anticorps primaires, les reconnaissent. Ils sont couplés à la

peroxydase, une enzyme oxydant un substrat. Cette réaction permet un dégagement de lumière (voir paragraphe concernant la révélation).

4.4.1 Etape de “ blocking ”

Avant de mettre en présence les anticorps primaires, une étape préliminaire consiste à saturer les sites non spécifiques de la membrane, pour éviter un bruit de fond important lors de la révélation. Par la suite, une réaction de compétition permettra un déplacement des protéines du lait, fixées de manière non spécifiques, en faveur des anticorps primaires dirigés spécifiquement contre un épitope.

Incuber la membrane dans une solution de Blocking 1 heure à température ambiante sous agitation. Cette étape peut aussi se faire à 4°C pendant une nuit.

Solution de Blocking (à préparer extemporanément):

	100 ml :
PBS 1X	10ml PBS10X
Tween 0,05%	50µl
Lait en poudre 5%	5 g

Filtrer la solution.

Enlever la solution de blocage et laver la membrane 3 x 15 minutes sous agitation dans du PBS-Tween 0,05%.

4.4.2 Mise en présence de l'anticorps primaire

La concentration du réactif immunologique varie de 1 à 50 mg/ml, en fonction de l'affinité des immunoglobulines pour leur épitope. Pour une immunodétection, les anticorps sont dilués à une concentration de 1 à 50 µg/ml.

Mettre la membrane en présence de l'anticorps primaire (10 µl dans 10 ml de PBS-Tween) sous agitation pendant une heure. Récupérer la solution contenant les anticorps et laver 3x 15 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween sous agitation.

4.4.3 Mise en présence de l'anticorps secondaire

Ce sont des anticorps dirigés contre le domaine F(c) des anticorps primaires. Les anticorps secondaires les plus couramment utilisés seront dirigés contre des Ig murins ou de lapins. Ils sont conjugués à la peroxydase, enzyme permettant un dégagement de lumière par l'oxydation d'un substrat peracide (le luminol) en un composé oxydé. L'émission de lumière est amplifiée par la présence d'agents chimiques comme les phénols, et maintenue plus longtemps.

Mettre la membrane en présence de l'anticorps secondaire (10 µl dans 10 ml de PBS-Tween) sous agitation pendant une heure. Laver 3x 15 minutes la membrane avec la solution PBS-Tween sous agitation.

4.4.4 Révélation

La technique de détection utilise les réactifs ECL (Amersham Pharmacia Biotech). Cette étape se déroule en chambre noire. La membrane est mise en présence d'une solution de révélation: S1 et S2 en un volume égal. Ce volume est fonction de la surface à couvrir: surface en cm² x 0.125 ml.

Mélanger S1 et S2 en quantité équimolaire et en recouvrir la membrane sur la face où les protéines ont été transférées. Incuber durant une minute. Oter la solution de détection et placer la membrane dans une cassette de révélation, recouverte d'un film plastique (type SaranWrap) et exposer un film autoradiographique pendant différentes durées: 30 secondes, 60 secondes, 5 minutes et 10 minutes. La figure 5d représente schématiquement le film autoradiographique suite à une exposition à une membrane.

Il faut savoir qu'une fois S1 et S2 mélangées, l'activité maximale de la peroxydase a lieu une à cinq minutes après le mélange puis elle décroît en fonction du temps.

Révéler les bandes par un bain au révélateur, le film est plongé dans la cuve jusqu'à ce qu'il apparaisse des bandes ou, le cas échéant, les bords de la membrane. Ensuite le rincer par un passage dans l'eau et enfin le passer une dizaine de secondes dans le fixateur. Rincer abondamment à l'eau de ville et laisser sécher.

Garder la membrane pour positionner les bandes en fonction des puits chargés et pour renseigner de l'échelle de taille.

4.4.5 Etape supplémentaire de Stripping

On peut effectuer une deuxième réaction d'immunodétection sur la même membrane, en utilisant des anticorps primaires différents. Pour cela, il faut "stripper", décrocher, les anticorps primaires par une étape de dénaturation.

Incuber la membrane 30 minutes à 50°C en présence d'un tampon de "stripping"

Laver 2x 15 minutes au TBS, sous agitation et à température ambiante.

Recommencer l'étape de blocking.

Tampon de "stripping":

	Pour 100 ml
Tris HCl pH 6,7 1,5M	4.2ml
β-mercapto-ethanol 100mM	700 µl
SDS 10%	20ml
eau distillée	porter à volume

5 Techniques relatives à l'ADN.

5.1 Les réactions de restriction.

5.1.1 Principe.

Une enzyme de restriction est une endonucléase qui reconnaît des sites spécifiques l'ADN. Ces enzymes hydrolysent le lien phosphodiester couplant deux nucléotides, libérant des fragments d'ADN dont l'un est bordé par un phosphate à l'extrémité 5' et l'autre est bordé d'un groupement hydroxyle à l'extrémité 3. On différencie les endonucléases sur le mode de coupure:

- coupures en bouts francs, par exemple : *EcoRV*, *SmaI*...
- coupures en bouts collants qui peuvent être à leur tour :
 - à extrémités 5' protrudantes, par exemple : *SacI*, *KpnI*, ...
 - à extrémités 3' protrudantes. par exemple : *EcoRI*, *BamHI*, ...

5.1.2 Réalisation pratique.

La réaction nécessite la mise en présence dans un eppendorf des composants suivants :

- l'ADN à restreindre
- le tampon de restriction (concentré 10x)
- la ou les enzymes de restriction (On considère que 5 unités sont suffisantes pour restreindre 1 µg d'ADN. Cette règle doit être modulée en fonction de l'occurrence des sites)
- l'eau distillée pour amener au volume final désiré (de 20 à 50 µl).

La restriction se déroule à une température optimale de 37°C durant une heure.

La réaction est arrêtée par ajout de bleu alourdisseur ou par élévation de température pour les enzymes thermosensibles.

Les enzymes sont stockées à -20°C.

5.1.3 Remarques.

1. Toutes les enzymes de restriction ne travaillent pas à une température de 37°C. L'enzyme *Sma I* restreint à une température de 25°C tandis que *Bcl I* travaille à 50°C.
2. La quantité d'enzyme nécessaire varie de 3 à 10 unités/µg d'ADN à restreindre. Le volume ne doit pas excéder 1/10ème du volume final car les enzymes sont conservées dans du glycérol et le tampon de restriction contient également du glycérol. Si la concentration de glycérol excède 5%, alors il devient néfaste parce que :
 - soit l'activité enzymatique diminue et la restriction est, dans ce cas, partielle;
 - soit l'enzyme acquiert une activité "star"

3. L'activité "star" d'une enzyme se manifeste sous des conditions particulières telles qu'une température élevée, une force ionique élevée, une forte concentration en ADN cible, la présence de solvants organiques (éthanol, par exemple). Cette activité consiste en l'hydrolyse des liens phosphodiesters en des sites similaires mais non identiques aux sites spécifiques de clivage de l'endonucléase.

5.2 L'électrophorèse sur gel d'agarose.

5.2.1 But.

L'électrophorèse sur gel d'agarose peut être envisagée dans plusieurs cas de figures. Cette technique permet d'une part de séparer des fragments de taille différente, et d'autre part d'estimer la taille, la concentration de l'ADN grâce à la migration simultanée d'un marqueur de taille à une concentration connue. Une dernière possibilité offerte par cette technique est d'estimer la qualité de la préparation ainsi que son degré de purification.

5.2.2 Principe et paramètres.

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une méthode de séparation de molécules, qui repose sur des vitesses de migration différentielles de molécules de taille différente. Plus la molécule est petite, plus vite elle migrera au sein du gel d'agarose.

La vitesse de migration dépend de plusieurs paramètres.

1. la taille des molécules ou fragments d'ADN : au plus le fragment est grand, au moins vite il migrera. En effet, la migration s'effectue de manière inversement proportionnelle au logarithme du poids moléculaire;
2. le pourcentage d'agarose : au plus le pourcentage d'agarose est élevé, au plus on sépare efficacement les fragments de petite taille comme le présente le tableau suivant :

Agarose (%)	Tailles séparées de façon optimale (kb)
0,5	30 à 1
0,7	12 à 0,8
1,0	10 à 0,5
1,2	7 à 0,4
1,5	3 à 0,2

3. l'intensité du champ électrique : la migration sera d'autant plus rapide que l'ampérage est important;
4. la conformation de la molécule d'ADN.

La molécule d'ADN est rendue visible par l'utilisation du bromure d'éthidium, une molécule chimique qui s'intercale entre les deux brins d'ADN et rend celui-ci visible aux ultraviolets à une longueur d'onde de 302nm.

5.2.3 Réalisation pratique.

La première étape : couler un gel.

Dissoudre par chauffage 1% d'agarose dans du TAE 1X. Ensuite couler la solution liquide dans un support et ajouter une petite quantité de bromure d'éthidium (de l'ordre de 2 à 5 μ l par 100 ml). Avant que la solution ne se solidifie, on rajoute le peigne permettant de créer le nombre et le volume de puits désirés.

La deuxième étape : charger le gel avec les échantillons.

Afin de pouvoir charger les échantillons dans les puits, il faut ajouter aux échantillons du tampon de chargement, un dixième du volume total, afin que les solutions tombent au fond des puits.

La troisième étape : la migration proprement dite.

Dans le cas d'une migration analytique, il faut faire migrer de manière simultanée un marqueur de taille.

On distingue deux types de migration :

1. analytique dont le but est de déterminer la taille et la quantité d'ADN.
2. préparative dont le but est de récupérer un fragment de taille déterminée en vue de le cloner dans un vecteur.

La quatrième étape : visualiser les bandes aux ultraviolets.

Le bromure d'éthidium, une molécule chimique qui absorbe l'énergie lumineuse à une longueur d'onde de 302 nm (dans les ultraviolets), va s'intercaler dans la double-hélice de l'ADN et rendre celui-ci visible lorsqu'il est exposé à une lumière ultraviolette.

5.3 La purification d'ADN.

Suite à une électrophorèse préparative sur gel d'agarose, plusieurs techniques existent afin de récupérer un fragment d'ADN d'intérêt de taille déterminée. Ce fragment peut être engagé de manière spécifique dans une réaction de ligation.

On distingue deux types de méthodes :

1. la récupération sur matrice
2. la récupération sur colonne.

5.3.1 La récupération sur matrice.

Cette technique utilise le kit d'extraction d'ADN de la firme MBI Fermentas.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.
- ajouter trois volumes de NaI fournie dans le kit. Si la bande récupérée pèse 100 mg, ajouter 300 µl de NaI. Incuber entre 45 et 55°C pendant 5 minutes pour dissoudre l'agar.
 - vortexer la solution-matrice avant l'emploi et ajouter 5 µl de cette solution à l'ependorf. Incuber 5 minutes à 55°C.
 - centrifuger à grande vitesse le complexe matrice-ADN pendant 10 secondes. Eliminer le surnageant.
 - laver le culot 2 fois avec 500 µl de la solution de lavage fournie dans le kit.
 - centrifuger à grande vitesse pendant 5 secondes. Ôter le surnageant.
 - éluer le DNA dans 10 µl d'eau. Centrifuger à grande vitesse pendant 5 secondes. Transférer le surnageant dans un eppendorf.
 - Recommencer cette dernière étape.

5.3.2 La récupération sur colonne.

Cette technique utilise le kit "QIAquick Spin" fourni par la firme QIAGEN.

Le temps nécessaire pour effectuer cette récupération est de 20 minutes.

Les étapes sont :

- exciser la bande d'intérêt du gel d'agarose au moyen d'un scalpel. Cette opération doit être réalisée le plus rapidement possible afin de diminuer l'exposition de l'ADN aux ultraviolets qui lui sont néfastes.
- pour chaque 100 mg de gel d'agarose, ajouter 300 µl de tampon QG fourni dans le kit. Pour des gels d'agarose plus concentrés (2%), ajouter le double du volume du tampon QG.
- incuber les échantillons 10 minutes à 50 °C. Vortexer les échantillons toutes les deux à trois minutes pour faciliter la dissolution de l'agarose.
- Après dissolution complète, vérifier que la couleur de la solution est jaune. Si elle est orange ou violette, le pH a changé. Dans ce cas, ajouter 10 µl d'acétate de sodium 3M, à pH 5. L'adsorption de l'ADN sur la colonne est optimale à pH égal ou inférieur à 7,5.
- ajouter un volume d'isopropanol (égal au volume de la bande) et mélanger.
- charger chaque échantillon sur une colonne QIAquick et placer chaque colonne sur un tube de 2 ml, et centrifuger 1 minute à 13000rpm.
- ôter le liquide et replacer la colonne sur le tube, ajouter 750 µl de tampon PE, pour laver la colonne. Laisser cinq minutes sur table, puis centrifuger à vitesse maximale 1 minute.
- ôter le surnageant et centrifuger à nouveau une minute à vitesse maximale. L'éthanol résiduel inhibe les réactions ultérieures.

- placer la colonne sur un eppendorf de 1,5 ml et ajouter 50 µl d'eau sur le centre de la membrane. Laisser sur table cinq minutes et centrifuger 60 secondes à vitesse maximale. L'ADN peut aussi être élué dans du tampon EB (Tris HCl 10 mM, pH8,5), fourni dans le kit.

Cette dernière technique est utilisée pour récupérer des bandes d'ADN très peu concentrées.

5.4 La réaction de ligation.

5.4.1 Principe.

La réaction de ligation consiste en la formation de liens phosphodiesters entre une extrémité 3'-OH et une extrémité 5'-PO₄³⁻. Cette réaction est catalysée par une enzyme du phage T4 : la T4 DNA ligase. Pour fonctionner l'enzyme a besoin de Mg²⁺ et d'ATP.

5.4.2 Réalisation pratique.

La ligation est une réaction qui nécessite la mise en présence de divers réactifs :

- la matrice restreinte,
- l'insert également restreint en des sites identiques ou compatibles à ceux de la matrice,
- le tampon de ligation (5X),
- la T4 DNA ligase,
- de l'eau stérile pour mettre au volume désiré.

Cette réaction se fait dans un volume minimal, afin de favoriser l'activité de l'enzyme. La ligation peut se dérouler à une température de 16 °C toute la nuit ou sur table pendant deux heures, ou les deux méthodes utilisées de manière successive. On recherche un compromis entre activité et stabilité. A la température de 16°C, l'enzyme offre une grande stabilité mais une faible activité. A 25°C, l'enzyme présente une forte activité mais est moins stable.

5.5 La transformation.

La transformation est une manipulation qui consiste en l'introduction dans une cellule d'un vecteur portant la construction d'intérêt. Il existe différents procédés pour rendre les cellules compétentes, c'est-à-dire réceptrices à cette introduction. On distingue la transformation bactérienne et la transformation de levure.

5.5.1 La transformation bactérienne.

Il existe différentes procédures pour transformer les cellules bactériennes. Ces procédures présentent des efficacités différentes.

- la transformation utilisant le chlorure de calcium, par choc thermique à 42°C.
- l'électroporation.

5.5.1.1 La transformation utilisant le chlorure de calcium.

principe.

Le calcium se lie à l'ADN plasmidique et le protège de l'action délétère des DNAases. Ce complexe ainsi formé se dépose sur les membranes cellulaires bactériennes. Suite à un choc thermique, la membrane se fragilise légèrement et de l'ADN peut pénétrer dans la cellule. Ces cellules potentiellement transformées sont placées dans un milieu non sélectif (ex : du LB) afin de favoriser l'expression des protéines de sélection encodées par des gènes portés sur le plasmide (ex : résistance à l'ampicilline). Afin de sélectionner les cellules réellement transformées, celles-ci sont placées en culture sur milieu sélectif (ex : LBamp). Seules les cellules dans lesquelles s'est introduit le plasmide pourront se développer sur ce milieu. L'efficacité de cette transformation est de 10^6 / μ g d'ADN pour les cellules DH10B de *E. coli*.

préparation de cellules CaCl₂ compétentes.

- inoculer une préculture de cellules d'*E. coli* DH10B de 50 ml de LB,
- laisser pousser toute la nuit à 37°C sous agitation,
- inoculer 400 ml de milieu LB avec 4 ml de la préculture dans un récipient stérile de 2 litres,
- incuber sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O._{590nm}=0,375 (délai de 2 à 3 heures),
- aliquoter la culture dans 8 tubes stériles de 50 ml,
- stopper la croissance dans la glace pendant 10 minutes,
- centrifuger 7 minutes à 3000 rpm à 4°C,
- ôter le surnageant et resuspendre les cellules dans 10 ml d'une solution de CaCl₂ froide,
- centrifuger les cellules 5 minutes à 2500 rpm à 4°C.
- resuspendre les cellules dans 2 ml de CaCl₂ froid
- aliquoter par 200 μ l dans des eppendorfs refroidis et conserver à -70°C.

Il est très important de travailler à 4°C afin de stopper la croissance cellulaire. L'efficacité de transformation est d'autant meilleure que cela est respecté.

La transformation proprement dite.

- décongeler sur glace 200 µl de cellules compétentes,
- ajouter 10 ng de l'ADN plasmidique d'intérêt (on ajoute souvent le résultat de ligation),
- incubé 20 minutes sur glace,
- effectuer un choc thermique à 42°C pendant deux minutes,
- ajouter rapidement 1 ml de LB;
- incubé à 37°C pendant une demi-heure à une heure afin de permettre l'expression des protéines de sélection,
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm, ôter le surnageant et resuspendre dans 200 µl de LB.
- étaler 100 à 200 µl de culture sur milieu sélectif à l'aide de billes d'étalement.

5.5.1.2 La transformation par électroporation.

principe.

Les cellules bactériennes, suspendues dans une solution de glycérol 10%, vont subir une différence de potentiel de plus de 2000 Volts pendant quelques secondes en présence de l'ADN. Cela va déstabiliser la membrane cellulaire et permettre un passage du vecteur à l'intérieur de la bactérie. Les cellules sont ensuite très vite suspendues dans du milieu SOC, un milieu très riche. On les laisse 30 minutes à une heure à 37°C pour permettre l'expression de gènes de sélection portés sur le ou les plasmides vecteurs. Afin de sélectionner les transformants, on étale les cellules sur un milieu sélectif adéquat.

Préparation de cellules électrocompétentes.

- inoculer une préculture de cellules d'*E. coli* KC8 (voir le chapitre *Souches et Plasmides*) de 50 ml de LB,
- laisser pousser toute la nuit à 37°C sous agitation,
- inoculer 400 ml de milieu LB avec 4 ml de la préculture dans un erlenmeyer à contre-paies stérile de 2 litres,
- incubé sous agitation à 37°C jusqu'à l'obtention d'une D.O._{590nm} comprise entre 0,4 et 0,8 (délai de 2 à 3 heures),
- aliquoter la culture dans 8 tubes stériles de 50 ml, et centrifuger 10 minutes à 14000 rpm à 4°C. Ôter le surnageant et rassembler dans un tube de 50 ml les différents culots resuspendus dans de l'eau stérile,
- laver 2 fois avec de l'eau stérile (50 ml),
- resuspendre le culot de cellules dans 50 ml d'une solution glycérol 10%, centrifuger 10 minutes à 4000 rpm
- ôter le surnageant et resuspendre les cellules dans 4 ml de glycérol 10 %, aliquoter par 50 µl dans des eppendorf refroidis et conserver à -80°C.

Préparation de l'ADN.

Les préparations d'ADN sont souvent riches en divers sels. Lors de l'électroporation, la solution va être soumise à un courant électrique intense et pour éviter un court-circuit, il vaut mieux enlever toute trace de sels. Une étape préliminaire à l'électroporation consiste à la dialyse de l'ADN.

Comme les quantités utilisées sont très petites, elle est réalisée sur une membrane de dialyse de 2,5 cm de diamètre et de 0,025 μm d'épaisseur. Cette membrane est disposée à la surface d'eau distillée puis on dépose 5 μl d'ADN. Après 40 minutes, on reprend la goutte (environ 10 μl).

La transformation proprement dite .

- dégeler sur glace 50 μl de cellules compétentes, et les transférer dans des cuvettes d'électroporation de 2 mm préalablement stérilisées par une exposition de 3 minutes aux U.V.,
- ajouter 10 μl de l'ADN plasmidique d'intérêt, préalablement dialysé,
- électroporer à 2,1 kV, 25 μF , 200 Ohm et avec un « time constant » de 4,8-5,1.
- ajouter rapidement 300 μl de SOC,
- incuber à 37°C pendant une demi-heure à une heure afin de permettre l'expression des protéines de sélection,
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm, ôter le surnageant et laver 5 fois dans 300 μl d'eau. Cette étape consiste à enlever toute trace de milieu riche, contenant tous les acides aminés, pour permettre une sélection de bactéries sur un milieu minimum.
- étaler 200 μl des cellules sur milieu sélectif à l'aide de billes d'étalement.

5.5.2 La transformation de levure.

5.5.2.1 La transformation utilisant le LiAc.

Principe.

Cette procédure permet de transformer des levures avec un voire deux plasmides en même temps. Le LiAc et le choc thermique perméabilisent la membrane. Ceci permet des mouvements de molécules vers l'intérieur ou vers l'extérieur. Le DNA single strand sperme de saumon augmente l'efficacité de transformation car il offre une fonction de "carrier" à l'ADN plasmidique. L'efficacité de transformation est estimée de 10^4 à 10^5 transformants par μg d'ADN.

Transformation.

- inoculer 5 ml de milieu de sélection pour la levure et incubé sous agitation toute la nuit à 30°C.
- inoculer une culture de 15 ml du même milieu avec la préculture et incubé à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la D.O. $_{600\text{nm}} = 0,8$ (délai : entre 4 à 5 heures)

Pour deux transformations :

- transférer 10 ml de culture dans un falcon et centrifuger à 5000 rpm à température ambiante pendant 5 minutes. Ôter le surnageant.

- resuspendre dans 10 ml d'eau stérile.
- centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante. Oter le surnageant.
- resuspendre dans 200 µl de LiAc 100 mM et transférer dans un eppendorf.
- microcentrifuger les cellules à haute vitesse 15 secondes et ôter le LiAc.
- resuspendre dans du LiAc de telle sorte que le volume total représente 100 µl (le culot vaut environ 20 µl).
- séparer en deux tubes, un pour chaque transformation.

Par transformation (pour un tube) :

- faire bouillir 80 µl de SS DNA pendant 5 minutes et mettre sur glace.
- centrifuger à grande vitesse pendant 15 secondes et ôter le LiAc.
- ajouter le mix de transformation dans l'ordre mentionné ci-dessous car le PEG protège les cellules des effets néfastes des fortes concentrations de LiAc. Le mix de transformation est :
 - 240 µl de PEG 50% (SIGMA 3350)
 - 36 µl de LiAc 1M
 - 50 µl de SS DNA (2 mg/ml)
 - 25 µl d'ADN à intégrer (0,1 à 1 mg/ml)
- vortexer chaque tube pendant une minute.
- incuber 30 minutes à 30°C.
- faire un choc thermique pendant 20 minutes dans un bain à 42°C.
- centrifuger à 6000 rpm pendant 15 secondes et ôter le mix de transformation.
- ajouter 200 µl d'eau stérile et resuspendre avec la pipette doucement.
- étaler sur milieu solide sélectif pour les intégrants. Etaler sur une boîte 50 µl et sur l'autre 150 µl de la transformation.

5.5.2.2 La transformation de levure pour un crible double-hybride.

Principe.

Le principe est identique à celui exposé ci-dessus, mais toutes les valeurs sont multipliées par 30 (30 transformations à la fois). L'efficacité de cette transformation est de $5 \cdot 10^4$ à 10^5 transformants par µg d'ADN.

La transformation.

inoculer 50 ml de milieu de sélection pour la levure, à partir d'une préculture de 5 ml, et incuber sous agitation toute la nuit à 30°C.

inoculer une culture de 150 ml du même milieu avec la préculture. La préculture doit être diluée pour obtenir une $D.O._{600nm} = 0,3$. Incuber à 30°C sous agitation jusqu'à ce que la $D.O._{600nm} = 0,75$ (délai : entre 3 à 4 heures);

- transférer en tubes de 50 ml et centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante
- ôter le surnageant et laver le culot de cellules à l'eau stérile avec 1/2 du volume (soit 25 ml), centrifuger 5 minutes à 5000 rpm à température ambiante. Oter le surnageant.
- resuspendre dans 3 ml de LiAc 100mM, pooler les trois culots en un tube. Laisser 15 minutes à 30°C. Pendant ce temps, préparer le mix de transformation, dans l'ordre :
 - 7200 µl de PEG 50% (SIGMA 3350)
 - 1080 µl de LiAc 1M

- 1500 μ l de SS DNA (2 mg/ml) bouilli pendant cinq minutes et mis sur glace préalablement
- 1020 μ l d'eau – volume d'ADN à intégrer
- 30 μ g d'ADN
- vortexer le tout pendant une minute
- centrifuger les cellules 5 minutes à 5000 rpm et ôter le LiAc.
- mettre le mix de transformation sur le culot de cellules et vortexer à nouveau une minute.
- incuber 30 minutes à 30°C.
- faire un choc thermique pendant 40 minutes dans un bain à 42°C et mixer par inversion toutes les cinq minutes pour équilibrer la température de toute la solution.
- centrifuger à 5000 rpm pendant 5 minutes et ôter le mix de transformation.
- Resuspendre dans un volume final de 9 ml d'eau stérile doucement à la pipette. Le culot de cellules fait environ 2 ml.
- prendre 1 et 10 μ l de cette solution et les diluer dans 300 μ l d'eau stérile, pour un contrôle d'efficacité.
- étaler 300 μ l de cellules par boîte de milieu solide sélectif pour les transformants.

5.6 La préparation d'ADN.

5.6.1 Minipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.

Cette méthode a pour but d'isoler l'ADN plasmidique présent dans une souche. Cet ADN va nous permettre de vérifier, par exemple si les constructions réalisées sont obtenues ou bien si le clone dont provient l'ADN est le clone d'intérêt. La quantité d'ADN récupéré (quelques μ g) est suffisante pour réaliser quelques restrictions diagnostiques

5.6.1.1 Culture des cellules.

- lancer des cultures de 5 ml de LB Amp, inoculées par un peu de colonies.
- incuber une nuit à 37°C sous agitation.

5.6.1.2 Lyse des cellules.

- transvaser 1,5 ml de chaque culture dans un eppendorf.
- centrifuger les colonies, 5 minutes à vitesse maximale.
- ôter le surnageant et resuspendre dans 300 μ l de S1 RNAase afin d'éliminer l'ARN, ajouter 300 μ l de S2 pour lyser les cellules. Laisser agir 5 minutes sur table.
- ajouter 300 μ l de S3 pour précipiter les membranes et débris cellulaires.
- centrifuger 20 minutes à 14000 rpm.
- récupérer le surnageant dans de nouveaux eppendorfs et ajouter 6 à 7 volumes (environ 630 μ l) d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- centrifuger 20 minutes à 14000 rpm.

5.6.1.3 Récupération de l'ADN.

- ôter le surnageant et ajouter 500 μ l d'éthanol 70% afin de laver le culot.
- centrifuger 5 minutes à 14000 rpm.

- sécher 5 minutes.
- resuspendre dans 50 µl d'eau distillée et vortexer.

5.6.1.4 Quantification de l'ADN.

Elle s'effectue par une comigration sur gel d'une petite quantité de plasmide linéarisé avec un marqueur de taille et de concentration.

5.6.2 Minipréparation d'ADN plasmidique par le protocole « Qiaprep Spin Miniprep Kit » de la firme QIAgen

Cette méthode est utilisée en remplacement de la méthode de minipréparation S1-S2-S3. Elle est plus rapide (cela prend environ 30 minutes) et assure l'obtention d'un ADN suffisamment clean pour le séquençage automatique.

5.6.2.1 Culture des cellules.

- lancer des cultures de 5 ml de LB Amp, inoculées par un peu de colonies.
- incuber une nuit à 37°C sous agitation.

5.6.2.2 *Lyse des cellules et récupération de l'ADN.*

- transvaser 1,5 ml de chaque culture dans un eppendorf.
- centrifuger les colonies, 5 minutes à vitesse maximale.
- ôter le surnageant et resuspendre le culot dans 250 µl de S1 RNAase, ajouter 250 µl de P2 fourni dans le kit et mélanger trois fois par inversion. Ajouter 350 µl de N3 fourni dans le kit et mélanger trois fois par inversion.
- centrifuger 10 minutes à 14000 rpm. Pendant ce temps, préparer le nombre adéquat de colonne QIAprep fournie dans le kit.
- placer le surnageant sur ces colonnes et centrifuger une minute à vitesse maximale. - ôter le liquide se trouvant dans le tube de récupération et mettre 750 µl de tampon PE (fourni dans le kit) et centrifuger une minute.
- ôter le liquide se trouvant dans le tube de récupération et centrifuger à nouveau une minute.
- placer la colonne sur un eppendorf et ajouter 50 µl d'eau distillée. Laisser cinq minutes sur table puis centrifuger une minute à vitesse maximale pour éluer l'ADN.

5.6.3 Midipréparation d'ADN plasmidique des bactéries.

Cette méthode a pour but d'isoler l'ADN plasmidique présent dans une souche afin d'en obtenir un stock pour réaliser des constructions ultérieures ou des transformations, ou pour poursuivre les vérifications.

5.6.3.1 *Culture des cellules.*

- lancer des cultures de 200 ml de LB Amp, inoculées par 2% de précultures liquides.
- incuber une nuit à 37°C sous agitation.

5.6.3.2 *Lyse des cellules.*

- transvaser la culture dans un Sorval 250 ml.
- centrifuger les colonies, 10 minutes à 5000 rpm.
- ôter le surnageant et resuspendre le culot dans 4 ml de S1 RNAase afin d'éliminer l'ARN, transférer la solution dans un corex 30, puis ajouter 4 ml de S2 pour lyser les cellules. Laisser agir pendant 5 minutes sur table. Ajouter 4 ml de P3 ou S3 pour précipiter les membranes et débris cellulaires, et incubé 10 minutes sur glace.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C. Récupérer le surnageant et le transférer dans un corex 30 ml.
- centrifuger 10 minutes à 13000 rpm à 4°C.

5.6.3.3 *Purification de l'ADN.*

On pourra opter soit pour une méthode rapide mais qui ne purifie pas très bien l'ADN, c'est la purification par passage sur filtre. Soit, on utilise une méthode meilleure, mais qui est plus longue, en passant sur colonne Nucleobond.

sur colonne Nucleobond AX100

- Préparation de la colonne Nucleobond AX100 : équilibrer la colonne avec 2 ml de solution N2.
- déposer l'ADN sur la colonne et attendre que tout soit élué.

- laver deux fois avec 4 ml de N3.
- éluer l'ADN grâce à 2 ml de N5 dans un corex 15.
- ajouter 1,4 ml d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C. Oter le surnageant et rincer le culot au moyen de 1 ml d'éthanol 70%. Eliminer l'éthanol.
- sécher 5 minutes.
- resuspendre dans 70 µl d'eau et vortexer.

sur filtre

- disposer un filtre sur un entonnoir, lui-même posé sur un corex 30 ml et laisser couler le surnageant contenant l'ADN.
- ajouter 6,3 ml d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C. Oter le surnageant et rincer le culot au moyen de 1 ml d'éthanol 70%. Eliminer l'éthanol.
- sécher 5 minutes.
- resuspendre dans 200 µl d'eau et vortexer.

5.6.3.4 *Quantification de l'ADN*

Elle s'effectue par une comigration sur gel d'une petite quantité de plasmide linéarisé avec un marqueur de taille et de concentration.

5.6.4 Maxipréparation d'ADN plasmidique

Cette méthode est utilisée pour amplifier de l'ADN en grande quantité. Dans le cadre de ce mémoire, ce fut utilisé pour préparer une banque plasmidique d'ADNc de *S.pombe* en concentration élevée pour faire des transformations servant à un crible double-hybride.

5.6.4.1 *Culture des cellules.*

- diluer la culture-stock de bactéries pour avoir un grand nombre de cellules sur boîte, mais non-jointives. Etaler sur 20 grandes boîtes de LBamp et incubé une nuit à 37°C sous agitation.
- ajouter 2x 1 ml d'eau distillée sur les boîtes et gratter les cellules à l'aide d'un rateau. Il faut enlever un maximum de cellules, remettre un volume d'eau distillée si nécessaire. Transférer le liquide contenant les bactéries dans deux biberons de 250 ml.

5.6.4.2 *Lyse des cellules.*

- centrifuger 10 minutes à 5000 rpm. Oter le surnageant et resuspendre chaque culot dans 6 ml de S1 RNAase. Transférer dans un corex 30 ml. Ajouter 6 ml de S2, laisser 5 minutes sur table puis ajouter 6 ml de S3 et laisser 10 minutes sur glace.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C puis transférer les surnageants dans un nouveau corex et centrifuger 10 minutes à vitesse maximale, à 4°C.

5.6.4.3 *Purification de l'ADN.*

- Préparation de la colonne Nucleobond AX500 : équilibrer la colonne avec 5 ml de solution N2.
- déposer l'ADN sur la colonne et attendre que tout soit passé au travers de la matrice.

- laver deux fois avec 12 ml de N3. Transférer la colonne sur un corex 25 ml.
- éluier l'ADN grâce à 12 ml de N5.
- ajouter 8,4 ml d'isopropanol afin de faire précipiter l'ADN.
- centrifuger 40 minutes à 13000 rpm à 4°C. Oter le surnageant et rincer le culot au moyen de 1 ml d'éthanol 70% froid. Eliminer un maximum d'éthanol par inversion.
- sécher 5 minutes à la pompe à vide.
- resuspendre dans 200 µl d'eau et bien vortexer.

5.6.4.4 Quantification de l'ADN.

Prendre plusieurs dilutions de l'ADN et ajouter 1 µl d'alourdisseur. Faire comigrer avec un marqueur de poids moléculaire (*Smart Ladder*) et quantifier l'ADN par rapport au marqueur. Une autre solution consiste à prendre la DO_{260nm} de 1µl des 200 µl. Une unité de DO correspond à 50 µg d'ADN.

Par exemple, si la DO_{260nm} de 1µl d'ADN vaut 0,02, il y a $0,02 \times 50 = 1$ µg d'ADN par µl.

5.6.5 Extraction plasmidique de levure

5.6.5.1 Culture des cellules.

Inoculer dans un milieu sélectif approprié la colonie contenant le plasmide d'intérêt. Laisser pousser une nuit à 30°C sous agitation.

5.6.5.2 Lyse des cellules.

- transférer en eppendorf et culotter les cellules par un quick spin.
- resuspendre le culot dans 200 µl de tampon de lyse. Ajouter 200 µl de billes (0,5 mm de diamètre) et 200 µl de phénol/chloroforme/acide iso amylique à pH 7,8.
 - vortexer 5x une minute et en gardant les échantillons sur glace entre les vortex
 - centrifuger 5 minutes à 5000 rpm. Reprendre la phase supérieure (aqueuse).
 - précipiter l'ADN avec 2 volumes d'éthanol 70% froid, mélanger et centrifuger 5 minutes à 5000rpm.
 - ôter l'éthanol et sécher 5 minutes. Resuspendre dans 100 µl de TE.

5.7 La PCR ou Polymerase Chain Reaction.

5.7.1 Principe.

Cette technique est utilisée pour amplifier rapidement un fragment d'ADN d'intérêt compris entre deux primers oligonucléotidiques. Les séquences bordant le fragment à amplifier doivent être connues afin de pouvoir synthétiser les oligonucléotides qui serviront d'amorce. Celles-ci sont complémentaires des brins opposés et leurs extrémités 3' sont orientées l'une

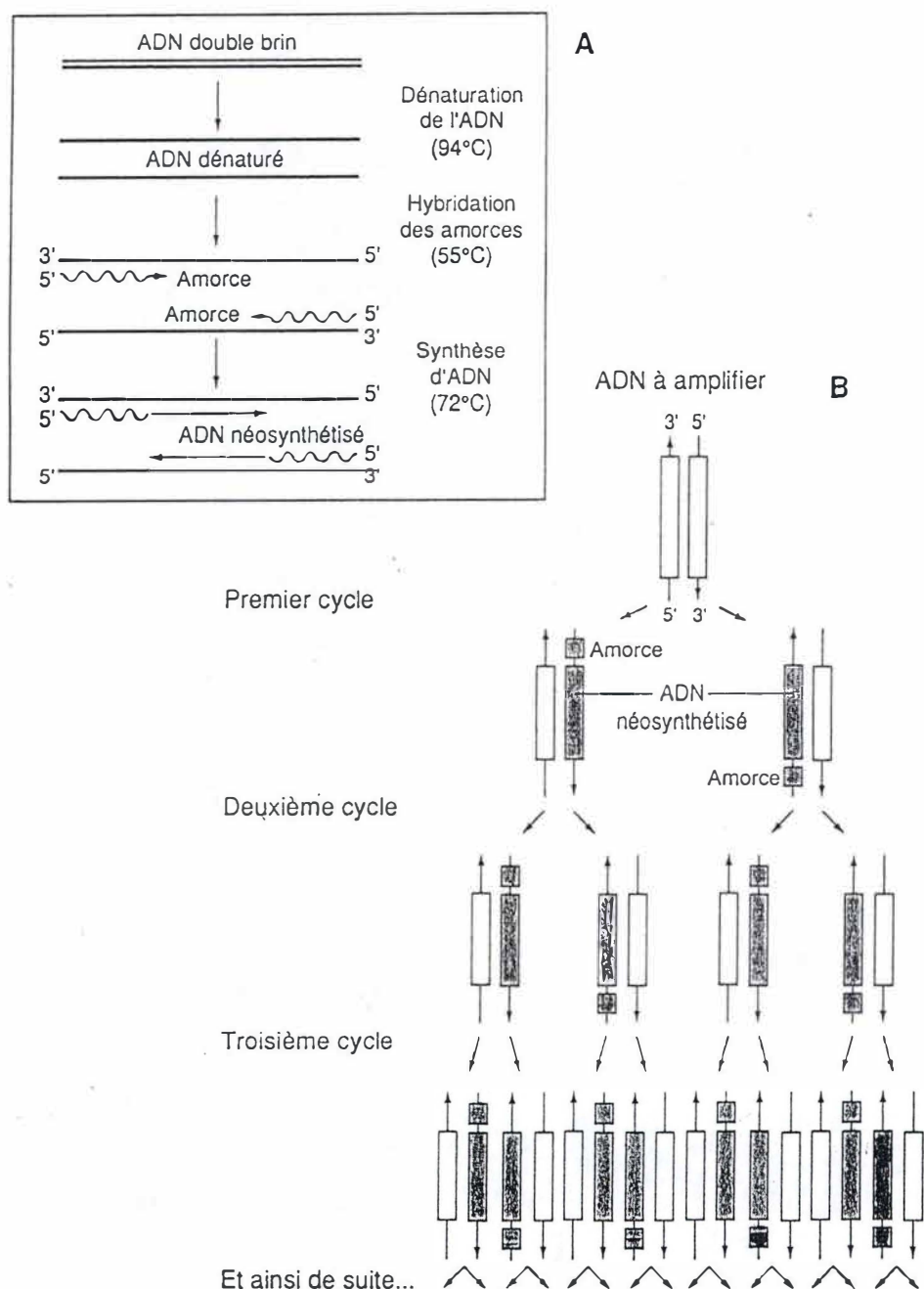


Figure 6: technique de la PCR.

A. Le mélange initial contient la séquence d'ADN à amplifier, les amorces complémentaires aux séquences bordant cette séquence, l'ADN polymérase et les nucléotides. Par une étape de dénaturation (à 94°C), les deux brins d'ADN sont séparés. Ensuite, à une température d'hybridation (entre 35 et 60°C), les amorces s'hybrident, et à 72°C, l'enzyme polymérise un nouveau brin d'ADN complémentaire à la séquence à partir de l'amorce.

B. La répétition de ces cycles de changements de température engendre une amplification exponentielle de la séquence initiale d'ADN.

(Figure issue de Bernot, 1999).

vers l'autre. L'ADN total est dénaturé par chauffage en présence d'un excès d'oligonucléotides. La diminution de température qui suit cette étape permet l'hybridation spécifique des oligonucléotides avec les séquences anticcomplémentaires. On amplifie l'ADN compris entre les deux amorces en présence de désoxynucléotides et d'une enzyme thermorésistante, la dynazyme ou Taq DNA Polymerase isolée de la bactérie *Thermus brockianus* qui allonge l'ADN de 5'en 3', ou la pfu isolée de *Pyrococcus furiosus*. Après une élongation des amorces sur base de la matrice à la température optimale d'action de l'enzyme, les deux brins (parental et néosynthétisé) sont dénaturés par chauffage et le cycle de température recommence. On recommence ce cycle un nombre de fois déterminé de telle sorte que l'amplification reste exponentielle. Le nombre d'amplicons est, en théorie, doublé à chaque cycle. Le produit de la PCR peut être utilisé pour le séquençage, ou pour l'analyse diagnostique de clones ou pour son insertion dans un vecteur. (Figure 6)

5.7.2 Réalisation pratique.

Différents éléments doivent être mis en présence :

- l'ADN d'intérêt
- les désoxynucléotides : 4 µl d'une solution concentrée 20 mmoles/ µl,
- les amorces oligonucléotidiques (concentration de 0,1nmole/ µl: 5 µl)
- le tampon de PCR(10X) : 10 µl,
- l'enzyme : 1 µl (l'activité est de 2 unités/µl),
- l'eau stérile afin d'arriver au volume désiré de 100 µl.

Un contrôle négatif doit être réalisé afin de vérifier si l'ADN amplifié n'est pas contaminé. Dans le tube de contrôle, tous les réactifs seront placés exception faite de l'ADN qui sera remplacé à volume égal par de l'eau stérile. Ce contrôle sera soumis au même processus de cycle de température que les autres tubes.

Une partie ou la totalité du produit PCR additionné de bleu alourdisseur est placé sur gel d'agarose en présence de bromure d'éthidium afin de vérifier la taille de l'amplicon et, le cas échéant, de le récupérer.

5.7.3 Récupération et purification de l'amplicon PCR

On charge le résultat de la PCR sur gel d'agarose. Après migration, on coupe les bandes contenant l'amplicon et on fait une purification par le protocole de purification d'ADN de la firme MBI Fermentas.

5.8 Le séquençage automatique de l'ADN

5.8.1 Principe.

Le séquençage automatique se réalise en tant qu'une élongation d'une chaîne d'ADN au départ d'un seul primer. Cette réaction utilise le principe de Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Au cours de la réaction, la polymérase ajoute des nucléotides triphosphates, soit des

didéoxyribonucléotides (ddNTPs), soit des déoxyribonucléotides (dNTPs). Les didéoxyribonucléotides se distinguent des dNTPs par la présence en 3' d'un hydrogène à la place d'un hydroxyle. Ces didéoxyribonucléotides sont parfaitement reconnus par la polymérase et sont ajoutés à la chaîne en croissance. Cependant, la perte du groupement hydroxyle en 3' leur interdit toute nouvelle formation d'un lien entre nucléotides. En conclusion, toute incorporation d'un didéoxyribonucléotide dans une chaîne d'ADN met un terme à son élongation. En conséquence, comme l'incorporation d'un ddNTP plutôt que du dNTP correspondant est aléatoire, cette réaction permet la synthèse de chaînes d'ADN de longueurs variées. Le séquençage permet d'établir la séquence de l'ADN en une seule réaction. En effet, chaque didéoxyribonucléotide est couplé de manière covalente à une molécule fluorescente de longueur d'onde déterminée, celle-ci est spécifique du ddNTP utilisé. Le produit de la PCR est placé sur un gel de polyacrylamide en présence d'urée qui sépare sur base de leur taille, les différentes chaînes synthétisées. Au plus la chaîne d'ADN est grande, au moins elle migre. Le séquenceur lit et identifie les nucléotides incorporés dans la chaîne et fournit la séquence grâce à la différence de longueur des chaînes et aux molécules fluorescentes. (Figure 7)

5.8.2 Réalisation pratique.

Nous utilisons le kit "ABI PRISM dye terminator" (Perkin Elmer). Le protocole est optimisé pour tout thermocycler de type PE Applied Biosystems thermal cyclers. Pour réaliser un séquençage correct, il est conseillé d'utiliser plusieurs primers qui répondent aux caractéristiques suivantes :

- un primer s'hybride sur un brin et l'autre sur le complémentaire.
- sur chaque brin, il est conseillé de choisir deux primers suffisamment distant pour permettre une connaissance de la séquence sur un grand nombre de paire de bases. Le séquenceur lit en une réaction 600 à 800 pb.

5.8.2.1 La réaction de synthèse des fragments de taille variable.

Pour chaque réaction, ajouter les réactifs suivants dans l'ordre mentionné ci-dessous :

- Terminator Ready reaction mix contenant les dRhodamine terminators : 4 µl
- Matrice : ADN double brin (100 à 200 ng/ µl) : 1 à 4 µl
- Primer (0,001 ng/µl) : 1,6 µl
- eau distillée pour aboutir à un volume total de 10 µl.

Bien mélanger et centrifuger brièvement.

Le programme de la réaction dure deux heures. Les étapes sont les suivantes pour l'appareil présent au laboratoire :

- augmentation rapide de température à 96°C pour dénaturer l'ADN.
- 96°C pendant 30 secondes.
- modification rapide de température pour atteindre 50°C pour hybrider les primers.
- 50°C pendant 15 secondes.
- rapide augmentation de température à 60°C pour allonger la chaîne de nucléotides.
- 60°C pendant 4 minutes.
- recommencer tout le cycle 25 fois.

5.8.2.2 La purification du produit.

- Pour chaque réaction de séquençage, préparer un eppendorf qui contient 1 µl d'acétate de sodium 3 M pH 4,6 et 25 µl d'éthanol 95%.

- Ajouter à ce mix l'entièreté du produit et mélanger la solution.
- Vortexer les tubes et les placer sur la glace 10 minutes afin de précipiter les produits.
- Microcentrifuger à 4°C pendant 30 minutes à grande vitesse.
- Oter le surnageant et laver le culot avec 125 µl d'Ethanol 70%.
- Microcentrifuger 5 minutes à grande vitesse et ôter le surnageant.
- Sécher le culot au Speed vak pendant trois minutes.

5.8.2.3 *L'électrophorèse sur ABI Prism377.*

Elle est réalisée sur gel de polyacrylamide en présence d'urée.

Bibliographie

Bibliographie

- Agatep, R., Kirkpatrick, R. D., Parchaliuk, R. D., Woods, R. A., and Gietz, R. D. (1998). Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by the lithium acetate/single strand carrier DNA/polyethylene glycol (LiAc/ss-DNA/PEG) protocol: Technical Tips Online).
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-402.
- Bachmair, A., Finley, D., and Varshavsky, A. (1986). In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234, 179-86.
- Bai, C., Sen, P., Hofmann, K., Ma, L., Goebel, M., Harper, J. W., and Elledge, S. J. (1996). SKP1 connects cell cycle regulators to the ubiquitin proteolysis machinery through a novel motif, the F-box. *Cell* 86, 263-74.
- Bernot, A. (1999). L'analyse des génomes, 2ème édition, Nathan, ed. (Paris).
- Boeke, J. D., LaCroute, F., and Fink, G. R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197, 345-6.
- Carbon, J., and Clarke, L. (1990). Centromere structure and function in budding and fission yeasts *New Biol.* 2, 10-9.
- Cenciarelli, C., Chiaur, D. S., Guardavaccaro, D., Parks, W., Vidal, M., and Pagano, M. (1999). Identification of a family of human F-box proteins. *Curr. Biol.* 9, 1177-9.
- Chang, E. C., Barr, M., Wang, Y., Jung, V., Xu, H. P., and Wigler, M. H. (1994). Cooperative interaction of *S. pombe* proteins required for mating and morphogenesis. *Cell* 79, 131-41.
- Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin-proteasome pathway: on protein death and cell life. *Embo J.* 17, 7151-60.
- Ciechanover, A., Orian, A., and Schwartz, A. L. (2000). Ubiquitin-mediated proteolysis: biological regulation via destruction. *Bioessays* 22, 442-51.
- Connelly, C., and Hieter, P. (1996). Budding yeast *SKP1* encodes an evolutionarily conserved kinetochore protein required for cell cycle progression. *Cell* 86, 275-85.
- Dubiel, W., and Gordon, C. (1999). Ubiquitin pathway : Another link in the polyubiquitin chain? *Curr. Biol.* 9, R554-557.
- Durfee, T., Becherer, K., Chen, P. L., Yeh, S. H., Yang, Y., Kilburn, A. E., Lee, W. H., and Elledge, S. J. (1993). The retinoblastoma protein associates with the protein phosphatase type 1 catalytic subunit. *Genes Dev.* 7, 555-69.
- Eichel, J., Gonzalez, J. C., Hotze, M., Matthews, R. G., and Schroder, J. (1995). Vitamin-B12-independent methionine synthase from a higher plant (*Catharanthus roseus*). Molecular characterization, regulation, heterologous expression, and enzyme properties. *Eur. J. Biochem.* 230, 1053-8.
- Espelin, C. W., Kaplan, K. B., and Sorger, P. K. (1997). Probing the architecture of a simple kinetochore using DNA-protein crosslinking. *J Cell. Biol.* 139, 1383-96.
- Fields, S., and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-6.
- Flores, A., Briand, J. F., Gadai, O., Andrau, J. C., Rubbi, L., Van Mullem, V., Boschiero, C., Goussot, M., Marck, C., Carles, C., Thuriaux, P., Sentenac, A., and Werner, M. (1999). A protein-protein interaction map of yeast RNA polymerase III. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 7815-20.

- Fromont-Racine, M., Rain, J. C., and Legrain, P. (1997). Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two- hybrid screens. *Nat. Genet.* 16, 277-82.
- Fukui, Y., Miyake, S., Satoh, M., and Yamamoto, M. (1989). Characterization of the *Schizosaccharomyces pombe ral2* gene implicated in activation of the *ras1* gene product. *Mol. Cell. Biol.* 9, 5617-22.
- Furnari, B. A., Russell, P., and Leatherwood, J. (1997). *pch1(+)*, a second essential C-type cyclin gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *J. Biol. Chem.* 272, 12100-6.
- Gilbreth, M., Yang, P., Wang, D., Frost, J., Polverino, A., Cobb, M. H., and Marcus, S. (1996). The highly conserved *skb1* gene encodes a protein that interacts with Shk1, a fission yeast Ste20/PAK homolog. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 13802-7.
- Hershko, A., and Ciechanover, A. (1998). The ubiquitin system. *Annu. Rev. Biochem.* 67, 425-79.
- Hilt, W., and Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* 21, 96-102.
- Huibregtse, J. M., Scheffner, M., Beaudenon, S., and Howley, P. M. (1995). A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 5249.
- Hutchison, C., and Glover, D. M. (1995). Cell cycle control. In *Frontiers in Molecular Biology*, C. Hutchison and D. M. Glover, eds. (Oxford: IRL PRESS).
- Jaquenoud, M., Gulli, M. P., Peter, K., and Peter, M. (1998). The Cdc42p effector Gic2p is targeted for ubiquitin-dependent degradation by the SCF^{Grr1} complex. *Embo J.* 17, 5360-73.
- Kaplan, K. B., Hyman, A. A., and Sorger, P. K. (1997). Regulating the yeast kinetochore by ubiquitin-dependent degradation and Skp1p-mediated phosphorylation. *Cell* 91, 491-500.
- Kipreos, E. T., Lander, L. E., Wing, J. P., He, W. W., and Hedgecock, E. M. (1996). *cul-1* is required for cell cycle exit in *C. elegans* and identifies a novel gene family. *Cell* 85, 829-39.
- Kitagawa, K., Skowyra, D., Elledge, S. J., Harper, J. W., and Hieter, P. (1999). *SGT1* encodes an essential component of the yeast kinetochore assembly pathway and a novel subunit of the SCF ubiquitin ligase complex. *Mol. Cell* 4, 21-33.
- Klopotowski, T., and Wiater, A. (1965). Synergism of aminotriazole and phosphate on the inhibition of yeast imidazole glycerol phosphate dehydratase. *Arch. Biochem. Biophys.* 112, 562-6.
- Kominami, K., Ochotorena, I., and Toda, T. (1998). Two F-box/WD-repeat proteins Pop1 and Pop2 form hetero- and homo- complexes together with cullin-1 in the fission yeast SCF (Skp1-Cullin- 1-F-box) ubiquitin ligase. *Genes Cells* 3, 721-35.
- Kominami, K., and Toda, T. (1997). Fission yeast WD-repeat protein Pop1 regulates genome ploidy through ubiquitin-proteasome-mediated degradation of the CDK inhibitor Rum1 and the S-phase initiator Cdc18. *Genes Dev.* 11, 1548-60.
- Leatherwood, J., Lopez-Girona, A., and Russell, P. (1996). Interaction of Cdc2 and Cdc18 with a fission yeast ORC2-like protein. *Nature* 379, 360-3.
- Lechner, J. (1994). A zinc finger protein, essential for chromosome segregation, constitutes a putative DNA binding subunit of the *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore complex, Cbf3. *Embo J.* 13, 5203-11.
- Lechner, J., and Carbon, J. (1991). A 240 kd multisubunit protein complex, CBF3, is a major component of the budding yeast centromere. *Cell* 64, 717-25.
- Lechner, J., and Ortiz, J. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore. *FEBS Lett.* 389, 70-4.

- Li, F. N., and Johnston, M. (1997). Grr1 of *Saccharomyces cerevisiae* is connected to the ubiquitin proteolysis machinery through Skp1: coupling glucose sensing to gene expression and the cell cycle. *Embo J.* 16, 5629-38.
- Maney, T., Ginkel, L. M., Hunter, A. W., and Wordeman, L. (2000). The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view. *Int. Rev. Cytol.* 194, 67-131.
- Moreno, S., and Nurse, P. (1994). Regulation of progression through the G1 phase of the cell cycle by the *rum1+* gene. *Nature* 367, 236-42.
- Murakami, Y., Matsufuji, S., Hayashi, S. I., Tanahashi, N., and Tanaka, K. (1999). ATP-Dependent Inactivation and Sequestration of Ornithine Decarboxylase by the 26S Proteasome Are Prerequisites for Degradation. *Mol. Cell. Biol.* 19, 7216-7227.
- Nuber, U., Schwarz, S., Kaiser, P., Schneider, R., and Scheffner, M. (1996). Cloning of human ubiquitin-conjugating enzymes UbcH6 and UbcH7 (E2-F1) and characterization of their interaction with E6-AP and RSP5. *J Biol. Chem.* 271, 2795-800.
- Ohta, T., Michel, J. J., Schottelius, A. J., and Xiong, Y. (1999). Roc1, a homolog of Apc11, represents a family of cullin partners with an associated ubiquitin ligase activity. *Mol. Cell* 3, 535-41.
- Patton, E. E., Willems, A. R., Sa, D., Kuras, L., Thomas, D., Craig, K. L., and Tyers, M. (1998). Cdc53 is a scaffold protein for multiple Cdc34/Skp1/F-box protein complexes that regulate cell division and methionine biosynthesis in yeast. *Genes Dev.* 12, 692-705.
- Russell, I. D., Grancell, A. S., and Sorger, P. K. (1999). The unstable F-box protein p58-Ctf13 forms the structural core of the CBF3 kinetochore complex. *J. Cell. Biol.* 145, 933-50.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463-7.
- Skowyra, D., Craig, K. L., Tyers, M., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1997). F-box proteins are receptors that recruit phosphorylated substrates to the SCF ubiquitin-ligase complex. *Cell* 91, 209-19.
- Skowyra, D., Koepp, D. M., Kamura, T., Conrad, M. N., Conaway, R. C., Conaway, J. W., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (1999). Reconstitution of G1 cyclin ubiquitination with complexes containing SCF^{Grr1} and Rbx1. *Science* 284, 662-5.
- Stemmann, O., and Lechner, J. (1996). The *Saccharomyces cerevisiae* kinetochore contains a cyclin-CDK complexing homologue, as identified by in vitro reconstitution. *Embo J.* 15, 3611-20.
- Stern, B., and Nurse, P. (1998). Cyclin B proteolysis and the cyclin-dependent kinase inhibitor Rum1p are required for pheromone-induced G1 arrest in fission yeast. *Mol. Biol. Cell.* 9, 1309-21.
- Verma, R., and Deshaies, R. J. (2000). A proteasome howdunit: the case of the missing signal. *Cell* 101, 341-4.
- Vidal, M., Brachmann, R. K., Fattaey, A., Harlow, E., and Boeke, J. D. (1996). Reverse two-hybrid and one-hybrid systems to detect dissociation of protein-protein and DNA-protein interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 10315-20.
- Wang, Y., Penfold, S., Tang, X., Hattori, N., Riley, P., Harper, J. W., Cross, J. C., and Tyers, M. (1999). Deletion of the Cull1 gene in mice causes arrest in early embryogenesis and accumulation of cyclin E. *Curr. Biol.* 9, 1191-4.
- Wolf, D. A., and Jackson, P. K. (1998). Cell cycle: oiling the gears of anaphase. *Curr. Biol.* 8, R636-9.
- Wolf, D. A., McKeon, F., and Jackson, P. K. (1999). F-box/WD-repeat proteins Pop1p and Sud1p/Pop2p form complexes that bind and direct the proteolysis of Cdc18p. *Curr. Biol.* 9, 373-6.